

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ»



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:
Επίδραση φυσικών και συνθετικών ενώσεων στο
αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα Keap1-Nrf2

Ιάσων-Σπυρίδων Νικολάου Πατεργιαννάκης
ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Παππάς Ιωάννης

Λάρισα, 2022

Επίδραση φυσικών και συνθετικών ενώσεων στο αντιοξειδωτικό
αμυντικό σύστημα Keap1-Nrf2

The effect of natural and synthetic compounds on the antioxidant
defense system Keap1-Nrf2

Επίδραση φυσικών και συνθετικών ενώσεων στο αντιοξειδωτικό
αμυντικό σύστημα Keap1-Nrf2

Φοιτητής: Πατεργιαννάκης Ιάσων - Σπυρίδων

Επιβλέπων Καθηγητής: Παππάς Ιωάννης

Εργαστήριο Φαρμακολογίας και Τοξικολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής,
Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Καρδίτσα, Ελλάδα

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κοντοπίδης Γεώργιος: Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Κτηνιατρικής,
Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Καρδίτσα, Ελλάδα

Κουρέτας Δημήτριος: Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών –
Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών
Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα

Παππάς Ιωάννης: Καθηγητής Κτηνιατρικής Φαρμακολογίας και
Τοξικολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Καρδίτσα, Ελλάδα

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	11
Περίληψη	12
Abstract	13
1. Εισαγωγή	14
1.1 Οξειδωτικό στρες και ROS	14
1.2 Αντιοξειδωτικά.....	15
1.3 Οξειδωτικό στρες και Βιομόρια	16
1.3.1 Νουκλεϊκά Οξέα	16
1.3.2 Πρωτεΐνες.....	17
1.3.3 Λιπίδια	17
1.3.4 Υδατάνθρακες.....	18
1.4 Οξειδοαναγωγή και σηματοδότηση	18
1.5 Ρύθμιση παθολογικών καταστάσεων	19
1.6 Nrf2 – Keap1	20
1.7 Φυσικές ουσίες.....	25
1.7.1 Βιθάνια	27
1.7.2 Βοσβελία η ιερή.....	27
1.7.3 Γαϊδουράγκαθο	28
1.7.4 Δεντρολίβανο.....	28
1.7.5 Ελιά.....	29
1.7.6 Ευφρασία	29
1.7.7 Θυμάρι	29
1.7.8 Καλέντουλα	30
1.7.9 Κυνόροδο	30
1.7.10 Λευκό μούρο.....	31
1.7.11 Μορίνγκα	31
1.7.12 Πρόπολη.....	32
1.7.13 Ρίγανη	32
1.7.14 Ροδιόλα	33
1.7.15 Σπαθόχορτο.....	33

1.7.16	Τσάι του βουνού	34
1.7.17	Φασκόμηλο	34
1.7.18	Φραγκοστάφυλλο.....	35
1.7.19	Χαμομήλι	35
1.8	1,4 Συζυγής προσθήκη	35
1.8.1	Η Χαλκόνη και παράγωγά της.....	36
1.8.2	Η Ιονόνη και τα παράγωγά της.....	36
1.8.3	Συνθετικές ενώσεις στην παρούσα εργασία	37
1.9	Στην παρούσα μελέτη.....	46
2.	Μέθοδοι και υλικά	47
2.1	Χημικά, Αντιδραστήρια και Υλικά	47
2.2	Εκχύλιση φυτών	49
2.3	Συνολικό Φαινολικό Περιεχόμενο	52
2.4	Αντίδραση με Θειόλες.....	52
2.5	Δοκιμή Εξουδετέρωσης ρίζας DPPH.....	53
2.6	Δοκιμή Εξουδετέρωσης ρίζας ABTS.....	54
2.7	Κυτταροκαλλιέργεια	54
2.8	Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας.....	55
2.9	Δοκιμασία κυτταρικής αύξησης.....	55
2.10	Προσδιορισμός πρωτεϊνικού περιεχομένου.....	55
2.11	Προσδιορισμός ενεργότητας κασπάσης-3.....	56
2.12	Απομόνωση RNA και RT-qPCR.....	56
2.13	Στατιστική ανάλυση	57
3.	Αποτελέσματα.....	58
3.1	Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο.....	58
3.2	Αντίδραση με Θειόλες.....	61
3.3	Αναστολή DPPH	64
3.4	Αναστολή ABTS	69
3.5	Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας.....	75
3.6	Δοκιμασία κυτταρικής αύξησης.....	81
3.7	Προσδιορισμός πρωτεϊνικού περιεχομένου	88

3.8	Προσδιορισμός ενεργότητας Κασπάσης.....	92
3.9	RT-qPCR.....	95
	Συζήτηση.....	99
1.	Αντιοξειδωτική δράση των φυτικών εκχυλισμάτων και χημικών ενώσεων.....	99
2.	Επίδραση των φυτικών εκχυλισμάτων και χημικών ενώσεων στον πολλαπλασιασμό και στην απόπτωση των κυττάρων K562	101
3.	Επίδραση των φυτικών εκχυλισμάτων και χημικών ενώσεων στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2.....	104
4.	Συμπεράσματα	105
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α: ΚΥΤΤΑΡΑ	106
	Συντομογραφίες	7
	Βιβλιογραφία	124

Συνομογραφίες

Αιθανόλη	Ethanol	EtOH
Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ	Ethylendiaminetetraacetic acid	EDTA
2,2' Αζινο-δι(3-αιθυλβενζοθιαζολιν-6-σουλφονικό οξύ)	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)	ABTS
Αναγωγή της Γλουταθειόνης	Glutathione reductase	GSR
Αναγωγή της Θειορεδοξίνης	Thioredoxin reductase	TrxR
Ανθρακικό Νάτριο	Sodium Carbonate	Na ₂ CO ₃
Αντιμεταφορέας κυστίνης-γλουταμινικού	Cystine/Glutamate antiporter	x-CT
Αντιοξειδωτική Ικανότητα ισοδύναμη του Trolox	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity	TEAC
Βασική περιοχή-Φερμουάρ Λευκίνης	basic region-Leucine Zipper	bZIP
Β-κύτταρα Λεμφώματος	B-cell Lymphoma	Bcl
Δέκτης Κατά Michael	Michael Acceptor	MA
Διμεθυλοσουλφοξείδιο	Dimethyl Sulfoxide	DMSO
2,2-Διφαινυλ-1-πικρυλυδραζίλη	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	DPPH
Δραστικές Μορφές Αζώτου	Reactive Nitrogen Species	RNS
Δραστικές Μορφές Αλογόνου	Reactive Halogen Species	RHS
Δραστικές Μορφές Ηλεκτρόφιλων	Reactive Electrophile Species	RES
Δραστικές Μορφές Οξυγόνου	Reactive Oxygen Species	ROS
Ενεργοποιητικός μεταγραφικός παράγοντας 4	Activating transcription factor 4	ATF4
Εντεροκύτταρα δωδεκαδακτύλου χοίρου	Intestinal porcine enterocytes from Jejunum	IPEC – J2

Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων	European Medicines Agency	EMA
Θειορεδοξίνη	Thioredoxin	Trx
Ισοδύναμα γαλλικού οξέος	Gallic acid equivalent	GAE
Ισοθειοκυανικό οξύ 1 της Μορίνγκα	Moringa isothiocyanate 1	MIC1
Καταλυτική υπομονάδα της Λιγάσης Γλουταμινικού-Κυστεΐνης	Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic subunit	<i>GCLC</i>
Κινάση-3β της Συνθάσης του Γλυκογόνου	Glycogen Synthase Kinase-3 beta	GSK3b
Κινάση του 3-φωσφοϊνοσιτιδίου	Phosphoinositide 3-kinase	PI3K
Κυτταρική σειρά ανθρώπινης προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας	Human promyelocytic Leukemia cell line	HL-60
Κύτταρα ανθρώπινου εμβρυονικού νεφρού	Human embryonic kidney cells	HEK-293
(Κυτταρική σειρά) Ηπατοκυτταρικού καρκινώματος	Hepatocellular Carcinoma (cell line)	HepG2
Μαλονδιαλδεΰδη	Malondialdehyde	MDA
Μεθανόλη	Methanol	MeOH
Μέλος 11 της οικογένειας 7 των διαλυτών μεταφορέων	Solute Carrier Family 7 Member 11	<i>SLC7A11</i>
(Μεταγραφικός παράγοντας) ομολογίας BTB και CNC 1	(Transcription Factor) BTB and CNC homology 1	BACH1
Μήκος Κύματος	Wavelength	wv
Μικρές πρωτεΐνες του μυοαπονευρωτικού ινοσαρκώματος	small Musculo-Aponeurotic Fibrosarcoma proteins	sMAF
Μιτοχονδριακό DNA	Mitochondrial DNA	mtDNA
N-ακετυλοκυστεΐνη	N-acetyl Cystein	NAC
Nrf2-ECH ομόλογα Κέντρα	Nrf2-ECH homology	Neh

3-Ο-ακετυλο-11-κετο-β-βωσβελικό οξύ	3-O-acetyl-11-keto-β-boswellic acid	AKBA –
Συνολικό περιεχόμενο σε Φαινολικές ουσίες	Total Phenolic Content	TPC
Όμοια με Kelch, ECH – συσχετιζόμενη, πρωτεΐνη 1	Kelch-like ECH-associated protein 1	Keap1
Οργανισμό τροφίμων και φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών	U.S. Food and Drug Administration	FDA
Ορός Νεογνού Βοδινού	Fetal Bovine Serum	FBS
Οσφρητικός υποδοχέας 51E2	Olfactory Receptor 51E2	OR51E2
Οξειδοαναγωγή 1 NAD(P)H:Κινόνη	NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1	<i>NQO1</i>
Οξυγενάσης-1 της αίμης	Heme Oxygenase-1	<i>HO-1</i>
Παρεμβάλουσα Περιοχή	Intervening Region	IVR
Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα	Polyunsaturated Fatty Acids	PUFA
Ποσοτική PCR με αντίστροφη μεταγραφή	Reverse Transcription quantitative PCR	RT-qPCR
Πρωτεΐνες που περιέχουν επαναλήψεις της β-Τρανσντουσίνης	β-Transducin repeats-Containing Proteins	β-TrCP
Πρωτεΐνες που προσδέουν RNA	RNA Binding Proteins	RBP
Πυρηνικός Παράγοντας- ενισχυτής της κ ελαφριάς αλύσου, των ενεργοποιημένων Β-κυττάρων	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	NF-κB
Στοιχεία Αντιοξειδωτικής Απόκρισης	Antioxidant Response Element	ARE
Συσχετιζόμενος με τον Προερχόμενο από τα Ερυθροειδή Πυρηνικό Παράγοντα 2, Παράγοντας 2	Nuclear factor-Erythroid derived 2-related factor 2	Nrf2

Τελικά Προϊόντα Προχωρημένης Γλύκωσης	Advanced Glycation End Products	AGE
Τριτοταγής-βουτυλο-υδροκινόνη	tert-Butyl-Hydroquinone	TBHQ
Υδροχλωρίδιο του Τριϋδροξυμεθυλαμινομεθανίου	Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride	Tris HCl
Τυπική Απόκλιση	Standard Deviation	SD
Υδατικό Διάλυμα	-	ΥΔ
4-Υδροξυνοενάλη	4-Hydroxynonenal	4-HNE
Υπερθειικό κάλιο	Potassium Persulfate	K ₂ S ₂ O ₈ PP
Υπεροξειδική Δισμουτάση	Superoxide Dismutase	SOD
Υπεροξειδάση της Γλουταθειόνης	Glutathione Peroxidase	GPx
Υποδοχέας α ρετινοειδών X	Retinoid X Receptor α	RXR-a
Υποδοχέας Αρυλ-υδρογονανθράκων	Aryl hydrocarbon Receptor	AhR
Φυσιολογικούς ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες	Normal Human Dermal Fibroblasts	NHDF
Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών Αλάτων	Phosphate Buffer Saline	PBS
-	Broad Complex, tramtrack, Bric-a-brac	BTB
-	Ring Box Protein	RBP

Ευχαριστίες

Η παρούσα Διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακολογίας και Τοξικολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από τον Οκτώβριο του 2021 έως τον Ιούλιο του 2022, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Παππά Ιωάννη.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Κτηνιατρικής Φαρμακολογίας και Τοξικολογίας του τμήματος Κτηνιατρικής, Δρ. Παππάς Ιωάννης που συμφώνησε να εκπονήσω τη διπλωματική εργασία υπό την επίβλεψή του. Καθοριστικό ρόλο στην περάτωση της εργασίας είχαν η καθοδήγησή του, το αμείωτο ενδιαφέρον του και η ενθάρρυνση που μου παρείχε.

Ευχαριστώ τους καθηγητές της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής μου. Ευχαριστώ ιδιαίτερος τον Καθηγητή Κοντοπίδη Γεώργιο για την διάθεση του εργαστηρίου σε όφελος της διεξαγωγής των πειραμάτων της διπλωματικής διατριβής και για την καλή συνεργασία. Ευχαριστώ τον Καθηγητή Κουρέτα Δημήτριο, για τις πολύτιμες συμβουλές τους και τις επικοδομητικές τους υποδείξεις.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Γεωργίου Σοφία για την απεριόριστη στήριξη και βοήθεια που μου παρείχε, για τις συμβουλές της, για την παροχή αντιδραστηρίων απαραίτητων για την διεξαγωγή των πειραμάτων αλλά και για την υπομονή και τη διάθεσή της, καθώς ήταν πάντα πρόθυμη να με καθοδηγήσει και συνέβαλλε στη δημιουργία ενός ευχάριστου εργασιακού περιβάλλοντος. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Κατσούλη Κωνσταντίνο για τη διάθεση του εργαστηρίου προς όφελος των πειραμάτων που διεξήχθησαν στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου για ηθική στήριξη, την απεριόριστη υποστήριξη και βοήθειά τους τόσο στον ψυχολογικό όσο και στον οικονομικό τομέα και για την συμβολή τους όλα αυτά τα χρόνια και ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περίληψη

Το οξειδωτικό στρες συμμετέχει σε φυσιολογικές λειτουργίες του κυττάρου, όμως όταν το στρες αυτό αυξάνεται, μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις μέσω πρόκλησης βλαβών σε σημαντικά για το κύτταρο μακρομόρια. Τα αντιοξειδωτικά συμβάλλουν στην καταπολέμηση των προοξειδωτικών και στην επαναφορά των οξειδωτικών επιπέδων στα φυσιολογικά επίπεδα. Το οξειδωτικό στρες παίζει ρόλο σε διάφορα μεταγωγικά μονοπάτια, καθώς είναι σημαντικό για την οξείδωση και την τροποποίηση αμινοξέων σε σημαντικές, για τη σηματοδότηση, πρωτεΐνες.

Η οξείδωση καταλοίπων κυστεΐνης οδηγεί σε τροποποίηση πρωτεϊνών στο κύτταρο, όπως είναι η πρωτεΐνη Keap1, η οποία ρυθμίζει το μεταγραφικό παράγοντα Nrf2. Το σύστημα Keap1-Nrf2 αποτελεί έναν από τους κύριους ρυθμιστές οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου. Η οξείδωση κυστεϊνικών καταλοίπων της Keap1 εμποδίζει τη δέσμευση του Nrf2, με αποτέλεσμα ο τελευταίος να είναι ελεύθερος ώστε να εισέλθει στον πυρήνα και να ρυθμίσει την έκφραση γονιδίων στόχων. Τα γονίδια στόχοι του Nrf2 συμπεριλαμβάνουν μεταξύ άλλων κυτταροπροστατευτικά και αντιοξειδωτικά γονίδια. Συνεπώς, η κατάλληλη ρύθμιση του Nrf2 συμβάλλει στον έλεγχο και στον περιορισμό του καρκίνου.

Στην εργασία αυτή ελέγχθηκε η επίδραση 19 φυσικών προϊόντων στα κύτταρα K562, η αντιοξειδωτική τους δράση και το περιεχόμενό τους σε φαινολικές ουσίες. Παράλληλα ελέγχθηκε η επίδραση 71 συνθετικών ενώσεων στα K562 και η αντιοξειδωτική τους δράση. Σε μερικές από αυτές τις ενώσεις δοκιμάστηκε η δυνατότητα αντίδρασης με θειόλες. Δύο από τις συνθετικές και 4 από αυτά τα φυσικά προϊόντα και η Ευγενόλη ελέγχθηκαν για την ικανότητά τους να ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων *HO-1*, *NQO1*, *GCLC* στα K562.

Το μέγιστο περιεχόμενο σε φαινολικές ουσίες το εμφάνισαν το *T. vulgaris* και η *R. rosea*. Το *T. vulgaris* εμφάνισε τη μέγιστη ικανότητα εξουδετέρωσης της DPPH• και η *R.rosea* τη μέγιστη ικανότητα εξουδετέρωσης της ABTS•. Καμία συνθετική ένωση δεν ανέδειξε ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση από αυτήν του καφεϊκού οξέος και της ευγενόλης. Όλα τα προς δοκιμή δείγματα επηρέασαν σε κάποιο βαθμό την κυτταρική αύξηση. Η ένωση 6, η ένωση 32, η Ευγενόλη, η *M. oleifera*, το *S. officinalis*, το *T. vulgaris*, αυξορρύθισαν όλα τα γονίδια στόχους του Nrf2 που ελέγχθηκαν. Το *R. officinalis* προκάλεσε μείωση της έκφρασης των *HO-1* και *NQO1* ενώ αύξηση της έκφρασης του *GCLC*.

Τα φυσικά προϊόντα με το ποικίλο περιεχόμενό τους επέδειξαν διάφορες δράσεις τόσο στα κύτταρα όσο και στις δοκιμές αντιοξειδωτικής δράσης. Από τις ενώσεις, η ένωση 32 με τη χαμηλή αντιδραστικότητά της στις Θειόλες μπορεί να αποτελεί έναν ειδικό επαγωγέα του Nrf2.

Abstract

Although oxidative stress participates in normal cell functions, when increased it can damage important molecules of the cell, leading to pathological conditions. Both endogenous and exogenous antioxidants scavenge oxidants and restore the oxidative levels of the cell. Oxidative stress is important for various signaling pathways, as it is important for the oxidation and the modification of proteins' amino acids. Among the most reactive amino acids are cysteine and methionine, as they contain thiol groups, prone to oxidation.

Oxidation of cysteine residues leads to modification of various proteins in the cell, such as Keap1, which regulates the transcription factor Nrf2. The Keap1-Nrf2 system is one of the main regulators of the redox state of the cell. Keap1 normally binds to Nrf2 and gets ubiquitinated. Nrf2 is then sent to proteasomes for degradation. Oxidation of cysteine residues of Keap1 inhibits the binding of Nrf2, leaving the latter free to enter the nucleus and regulate the expression of its target genes. Nrf2 target genes include, among others, cytoprotective and antioxidant genes. Therefore, proper regulation of Nrf2 is necessary for the control of cancer.

In this study, we tested the effect of 19 natural products on K562 cells, their antioxidant activity and their content in total phenolic content. At the same time, the effect of 71 different synthetic compounds on K562 and their antioxidant activity were tested. Some of these compounds were tested for their reactivity with thiols. Two of the synthetic compounds, 4 of the natural products and Eugenol were tested for their ability to regulate *HO-1*, *NQO1*, *GCLC* expression in K562 cells.

T. vulgaris and *R. rosea* showed the highest total phenolic content. *T. vulgaris* showed the highest DPPH• scavenging capacity and *R. rosea* showed the highest ABTS• scavenging capacity. No synthetic compound exhibited a stronger antioxidant activity than Caffeic acid and Eugenol. Every tested sample affected the cell growth. Compounds 6 and 32 and Eugenol upregulated the 3 Nrf2 target genes. *M. oleifera*, *S. officinalis*, *T. vulgaris* also upregulated all the 3 genes. On the other hand, *R. officinalis* downregulated *HO-1* and *NQO1* but increased the expression of *GCLC*.

The natural products as expected by their various content in substances, they exhibited a variety of effects on cells and the antioxidant assays. Compound 32 has a low reactivity with thiols but upregulates Nrf2 target genes. Thus Compound 32 might be a specific Nrf2 activator.

1. Εισαγωγή

Από τα τέλη του 18^{ου} αιώνα είχε αναγνωριστεί η επίδραση του περιβάλλοντος στην υγεία του ανθρώπου¹. Ιδιαίτερη βαρύτητα δόθηκε στη σχέση περιβαλλοντικών παραγόντων και καρκινογένεσης, ειδικά με την παρατήρηση της αύξησης της συχνότητας των καρκίνων με την έκθεση των ανθρώπων σε κάρβουνο¹. Λίγο μετά τα μέσα του 20^{ου} αιώνα παρατηρήθηκε το αναγκαίο βήμα μετατροπής μερικών ουσιών σε ηλεκτρόφιλες ενώσεις και σε δραστικά μόρια, προκειμένου να καταστούν καρκινογόνες¹. Η ενεργοποίηση αυτή μπορεί να συμβεί με πολλά μεταβολικά ένζυμα¹. Το ενδιαφέρον γρήγορα στράφηκε και σε ενώσεις που θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως παρεμποδιστές του καρκίνου εμποδίζοντας το στάδιο της μεταβολικής ενεργοποίησης ή ενισχύοντας τη διαδικασία της αποτοξίνωσης¹. Τέτοια μόρια είναι διάφορα φυσικά προϊόντα (όπως τα φλαβονοειδή και οι φαινόλες) και αντιοξειδωτικά, καθώς και ενώσεις που κατηγοριοποιούνται ως δέκτες της αντίδρασης Michael¹.

1.1 Οξειδωτικό στρες και ROS

Ο όρος «οξειδωτικό στρες» εισήχθη στην έρευνα για πρώτη φορά το 1985 από τον Sies^{2,3}. Το οξειδωτικό στρες αναφέρεται στην διαταραχή της ισορροπίας οξειδωτικών (ελεύθερων ριζών) και αντιοξειδωτικών συστημάτων^{4,5}, η οποία μπορεί να προκαλέσει βλάβες σε διάφορα μόρια και μεταβολές στην σηματοδότηση⁴. Η ανισορροπία οξειδωτικών-αντιοξειδωτικών ελαφρώς προς τα οξειδωτικά είναι φυσιολογική, ονομάζεται καλό στρες (eustress) και οι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα υπό αυτές τις συνθήκες είναι απαραίτητες για τη λειτουργία του κυττάρου με την επαγωγή συγκεκριμένων μονοπατιών^{4,6}. Ωστόσο, η υπέρμετρη αύξηση του οξειδωτικού στρες με μεγάλη διαφορά οξειδωτικών – αντιοξειδωτικών υπέρ των οξειδωτικών, οδηγεί σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις και ονομάζεται οξειδωτικό φορτίο ή δυσφορία (distress)^{4,6}. Η αυξημένη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species – ROS) ή αζώτου (Reactive Nitrogen Species – RNS) και/ή η αδυναμία καταπολέμησής τους μπορεί να οδηγήσει σε ανάπτυξη οξειδωτικού στρες⁵. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου μπορεί να είναι είτε ελεύθερες ρίζες οξυγόνου είτε δραστικά οξυγονομένα μόρια όπως το H₂O₂⁵. Ελεύθερες ρίζες είναι τα στοιχεία (μόρια, άτομα, ή ιόντα) με ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στιβάδα (Εικόνα 1). Συναντώνται και δραστικές μορφές άλλων στοιχείων (Αζώτου, Θείου, Χαλκού, Σιδήρου)⁵, όπως επίσης και δραστικές μορφές ηλεκτρόφιλου (Reactive Electrophile Species – RES) και δραστικές μορφές αλογόνου (Reactive Halogen Species – RHS)⁴. Η παραγωγή ελεύθερων ριζών μπορεί να οφείλεται τόσο σε φυσιολογικές αερόβιες διαδικασίες όσο και σε επιμολυντές και τοξίνες⁵.



Εικόνα 1: Ελεύθερη ρίζα

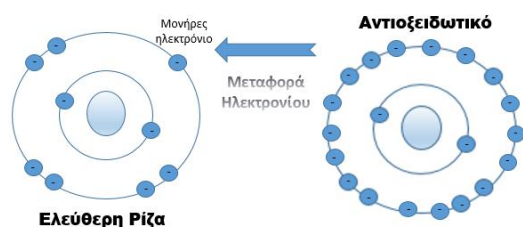
Οι ROS είναι φυσιολογικά χημικά στοιχεία τα οποία συμμετέχουν ως σηματοδοτικά μόρια σε διαδικασίες όπως η ρύθμιση της απόπτωσης, ενώ παράλληλα έχουν σημαντικό ρόλο στο ανοσοποιητικό κατά την άμυνα έναντι παθογόνων μικροοργανισμών⁵. Ωστόσο, σε μεγάλες ποσότητες οι ROS δρουν κυτταροτοξικά και η κατάσταση αυτή μπορεί να συνδεθεί με

παθολογικές καταστάσεις (όπως καρκίνος, κίρρωση, ουρολιθίαση, νευρολογικές διαταραχές, διαβήτης και καρδιαγγειακές νόσοι)⁵. Αυτό συμβαίνει καθώς οι δραστικές μορφές μπορούν να αντιδράσουν και να οξειδώσουν μέταλλα, θειόλες, κετοξέα, DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες, ελεύθερα αμινοξέα, σάκχαρα και άλλες οργανικές και ανόργανες ενώσεις⁵. Κάποια αμινοξέα, όπως τα αρωματικά ή αυτά που περιέχουν σουλφυδριλομάδες είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα σε οξείδωση. Το κύτταρο έχει ένζυμα (δισουλφιδικές αναγωγάσες) που ανάγουν τις οξειδωμένες θειόλες (από κυστεΐνη και μεθειονίνη)⁵. Οι ROS οδηγούν σε μεταβολές στην δραστικότητα ενζύμων και άλλων πρωτεϊνών, με διαφόρους τρόπους, ένας εκ των οποίων είναι σημαντικός και αποτελεί την οξείδωση θειολικών ομάδων⁵.

1.2 Αντιοξειδωτικά

Τα αντιοξειδωτικά είναι ενώσεις που μπορούν ακόμα και σε χαμηλές, συγκριτικά με τον στόχο οξείδωσης, συγκεντρώσεις να εμποδίσουν ή να μειώσουν την οξείδωση του υποστρώματος - στόχου⁵. Τα αντιοξειδωτικά μειώνουν το οξειδωτικό στρες και τις συνέπειες αυτού⁵. Τα αντιοξειδωτικά συστήματα διακρίνονται ανάλογα με το μηχανισμό δράσης στα

(ενζυμικά ή μη) συστήματα που παρεμποδίζουν την παραγωγή δραστικών μορφών, σε (ενζυμικά ή μη) συστήματα που εμποδίζουν τη δράση των παραχθέντων ROS (Εικόνα 2) και σε ενζυμικά συστήματα επιδιόρθωσης των βλαβών⁵. Υπάρχουν και άλλοι τρόποι κατηγοριοποίησης των αντιοξειδωτικών συστημάτων ανάλογα τη δραστικότητα και τη διαλυτότητά τους. Έτσι, τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε πρώτης γραμμής άμυνας αντιοξειδωτικά, στα οποία περιλαμβάνονται τα ενζυμικά συστήματα και σε δεύτερης γραμμής άμυνας στα οποία περιλαμβάνονται αντιοξειδωτικά μικρού μοριακού βάρους και θειόλες⁵. Οι μικρού μοριακού βάρους ενώσεις εξουδετερώνουν στοιχεία σε ηλεκτρονικά διεγερμένη κατάσταση όπως είναι το μονήρες μοριακό οξυγόνο, κάτι που δεν υπάρχουν ένζυμα ικανά να το πραγματοποιήσουν⁶. Τα αντιοξειδωτικά της δεύτερης γραμμής άμυνας ανάλογα τη διαλυτότητά τους διακρίνονται σε λιποδιαλυτά και σε υδατοδιαλυτά⁵.



Εικόνα 2: Εξουδετέρωση ελεύθερης ρίζας με μεταφορά ηλεκτρονίου από το αντιοξειδωτικό.

Σε φυσιολογικές συνθήκες τα αντιοξειδωτικά συστήματα δρουν καταπολεμώντας τα προ-οξειδωτικά στο κύτταρο, όπου επικρατεί μία κατάσταση ελαφριού οξειδωτικού στρες⁵. Με την αύξηση όμως της ηλικίας τα αντιοξειδωτικά συστήματα δεν επαρκούν και το οξειδωτικό στρες αυξάνεται⁵. Στην περίπτωση αυτή το οξειδωτικό στρες μπορεί να μειωθεί με τη χορήγηση εξωγενών αντιοξειδωτικών όπως είναι οι βιταμίνες C και E, διάφορα φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα και άλλες ενώσεις των οποίων η πρόσληψη μπορεί να γίνει μεταξύ άλλων τρόπων και από τροφές φυτικής προέλευσης⁵. Η ενίσχυση με εξωγενή αντιοξειδωτικά είναι ωφέλιμη για την καταπολέμηση οξειδωτικού στρες, όταν οι ενδογενείς μηχανισμοί δεν επαρκούν, δηλαδή όταν το οξειδωτικό στρες είναι σε μεγαλύτερα επίπεδα από τα φυσιολογικά για το άτομο επίπεδα (distress). Στο κύτταρο υπάρχουν αντισταθμιστικοί μηχανισμοί που μειώνουν τα ενδογενή

αντιοξειδωτικά, σε περίπτωση αύξησης των εξωγενών⁵. Η υπερβολική πρόσληψη αντιοξειδωτικών οδηγεί σε παρόμοια κατάσταση με αυτή του οξειδωτικού στρες, η οποία ονομάζεται αντιοξειδωτικό⁵ ή αναγωγικό⁴ στρες και έχει όμοια αποτελέσματα⁵. Διαφορετικά αντιοξειδωτικά ενδέχεται να έχουν διασταυρούμενες δράσεις και έτσι να παρουσιάζουν συνεργειακή δράση⁵.

Στα ενδογενή αντιοξειδωτικά περιλαμβάνονται διάφορα ενζυμικά συστήματα, μεταξύ αυτών: η υπεροξειδική δισμουτάση (Superoxide Dismutase – SOD) η οποία καταλύει την μετατροπή της ρίζας υπεροξειδικού ανιόντος ($O_2^{\cdot-}$) σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), η καταλάση⁵, η οποία καταλύει την αντίδραση $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ ⁷, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase - GPx), η οποία καταλύει την αναγωγή του H_2O_2 σε H_2O , με ταυτόχρονη οξείδωση της γλουταθειόνης. Η αντίδραση με τη γλουταθειόνη είναι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα της αντιοξειδωτικής δράσης τωνθειολών. Οιθειόλεςείναιεπίσηςενδογενήαντιοξειδωτικάκαιοικυστεΐνεςπουβρίσκονταισεδιάφορεςπρωτεΐνες/μεταλλοπρωτεΐνεςμπορούννααντιδράσουνμεROS⁵. Ηοξείδωσηθειολώνείναιέναςτρόποςρύθμισηςμεταγραφικώνπαραγόντωνκατάτηνοξειδοαναγωγικήσηματοδότηση⁸. Άλλεςενδογενείςαντιοξειδωτικέςενώσειςείναιτοουρικόοξύ, ημελατονίνη, τοσελήνιοσεοργανικάσύμπλοκα, πρωτεΐνεςπουπροσδέχουνμέταλλα, ηχολερυθρίνηκαιάλλα⁵.

Στα εξωγενή αντιοξειδωτικά συμπεριλαμβάνονται το ασκορβικό οξύ (Βιταμίνη C), το οποίο μπορεί να αντιδράσει με ROS και RNS και σε συνεργασία με την τοκοφερόλη (Βιταμίνη E - εξωγενές αντιοξειδωτικό) μπορεί να εξουδετερώσει λιπόφιλες ρίζες⁵. Άλλα εξωγενή αντιοξειδωτικά είναι τα καροτενοειδή (όπως β-καροτένιο, λυκοπένιο), οιφαινολικέςουσίες(όπωςφαινολικάοξέα,φλαβονοειδή), οιλεκιθίνες, ηακετυλο-κυστεΐνη, τοσελήνιο(αυξάνειτηνενεργότητατηςGPx, οψευδάργυρος(συμπαράγονταςτουSODκαισταματάτηνοξείδωσηλιπιδίωναπόσίδηροκαιχαλκό)⁵.

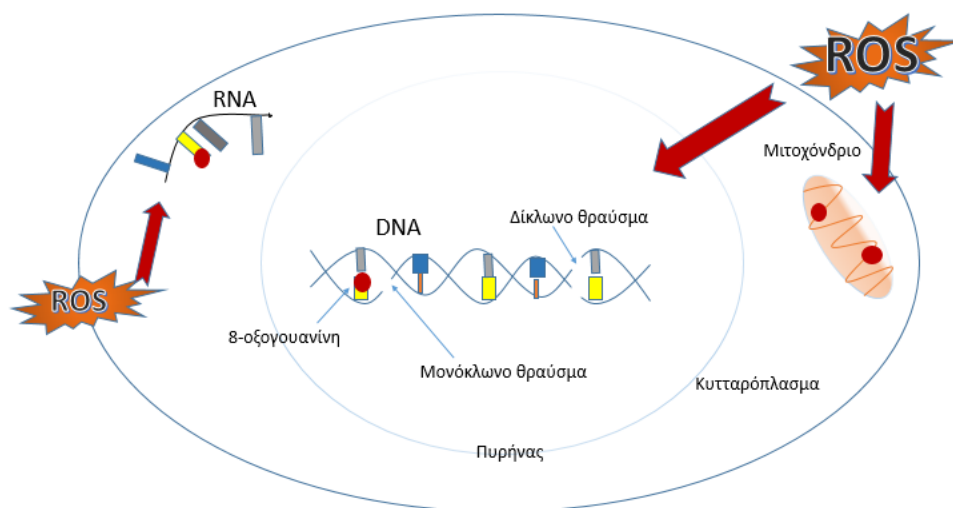
1.3 Οξειδωτικό στρες και Βιομόρια

Οι ελεύθερες ρίζες και τα δραστικά στοιχεία μπορούν να αντιδράσουν με διάφορα βιομόρια έχοντας ως αποτέλεσμα είτε την αλληλεπίδραση με ένα σηματοδοτικό μονοπάτι, είτε σε βλάβη μακρομορίων που μπορεί να οδηγήσει σε παθολογική κατάσταση^{6,9}. Η βλάβη των μακρομορίων είναι συνέπεια της αποφυγής κάποιων δραστικών μορφών από τα αντιοξειδωτικά συστήματα⁹.

1.3.1 Νουκλεϊκά Οξέα

Η οξείδωση των νουκλεϊκών οξέων επηρεάζει την φυσιολογία του κυττάρου. Βλάβη του DNA από οξείδωση μπορεί να προκαλέσει γενωμική αστάθεια, αύξηση των μεταλλάξεων, απώλεια ετεροζυγωτίας, μείωση του μεγέθους των τελομερών, ρύθμιση της έκφρασης (Εικόνα 3)^{6,9}. Μια αρκετά μελετημένη τροποποίηση βάσης αποτελεί η οξείδωση της γουανίνης σε 8-οξογουανίνη, η συσσώρευση της οποίας είναι ογκογόνα και οδηγεί σε δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, αφού το μιτοχονδριακό DNA (mitochondrial DNA – mtDNA) είναι ιδιαίτερα επιρρεπές σε οξείδωση^{6,9}. Η βλάβη του mtDNA συσχετίζεται με διάφορες ασθένειες (όπως Parkinson) και με τη γήρανση⁹. Η

οξείδωση RNA μορίων επηρεάζει τις φυσιολογικές λειτουργίες του κυττάρου αφού μπορεί να επηρεάσει την πρωτεϊνική σύνθεση και διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια. Για παράδειγμα η οξείδωση του miRNA184 προκαλεί τη στόχευση mRNA πρωτεϊνών B κυττάρων λεμφώματος (B-cell Lymphoma – Bcl), με αποτέλεσμα τον παρεμπόδισμό της μετάφρασής τους και την απόπτωση του κυττάρου⁶. Επιπλέον, η ύπαρξη τροποποιημένων βάσεων σε μόρια mRNA οδηγεί σε μειωμένη πρωτεϊνοσύνθεση⁹.



Εικόνα 3: Οξείδωση των νουκλεϊκών οξέων, σχηματισμός 8-οξογουανίνης και αποσταθεροποίηση του DNA.

1.3.2 Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες στο κύτταρο και στο πλάσμα βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις και μπορούν εύκολα να αντιδράσουν με οξειδωτικά¹⁰. Είναι, λοιπόν, εύλογο το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες είναι επιρρεπείς σε τροποποιήσεις λόγω οξείδωσης¹⁰. Οι τροποποιήσεις των πρωτεϊνών λόγω οξείδωσης, συμβαίνουν με 3 κύριους μηχανισμούς (αφαίρεση υδρογόνου, απόσπαση ηλεκτρονίου από αναγωγική περιοχή πλούσια σε ηλεκτρόνια, ή αντίδραση προσθήκης σε πυρηνόφιλη περιοχή, πλούσια σε ηλεκτρόνια)¹⁰. Τροποποιήσεις μπορούν να συμβούν στις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων ή και στον πεπτιδικό σκελετό¹⁰. Οι αντιδράσεις οξείδωσης μπορούν να προκαλέσουν θραυσματοποίηση του πρωτεϊνικού σκελετού, αλλαγή της δομής της πρωτεΐνης, αλλαγή στη διαλυτότητα και συσσωμάτωση των πρωτεϊνών¹⁰. Η οξείδωση των πρωτεϊνών, παρά το ότι είναι επιβλαβής για τις πρωτεΐνες και το κύτταρο, μπορεί να είναι μέρος της φυσιολογικής και σωστής τροποποίησης κατά το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών στο ενδοπλασματικό δίκτυο⁶.

1.3.3 Λιπίδια

Η λιπιδική υπεροξείδωση συμβαίνει κυρίως σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Polyunsaturated Fatty Acids – PUFA) με ή χωρίς την συμβολή ενζύμων (κυκλοοξυγενάσες, κυτοχρώματα P450, λιποξυγενάσες)¹¹. Τα λιπιδικά υπεροξειδία διακρίνονται σε λιπιδικά ενδοπεροξειδία, τα οποία παίζουν ρόλο στη φλεγμονή και στη σύνθεση προσταγλανδινών και σε λιπιδικά υδροπεροξειδία, τα οποία συσχετίζονται με τον κυτταρικό θάνατο¹¹. Η υπεροξείδωση των λιπιδίων της μεμβράνης

μπορεί να μεταβάλλει άμεσα τη δομή της κυτταρικής μεμβράνης, την ακεραιότητάς της, τη διαπερατότητα, τη σταθερότητα, την διακυτταρική αναγνώριση, τη διαβάθμιση ιόντων. Τα υπεροξειδία των λιπιδίων αποδομούνται σε υδροξυ-οξέα και σε δραστικές αλδεΐδες όπως είναι η μαλονδιαλδεΐδη (malondialdehyde – MDA) και η 4-υδροξυνονενάλη (4-hydroxynonenal – 4-HNE)¹¹. Η MDA αντιδρά με πρωτεΐνες και το DNA και η 4-HNE είναι ένας δέκτης κατά Michael (Michael acceptor) και αντιδρά ομοιοπολικά με αμινοξέα αλλάζοντας τη δομή και τη λειτουργία πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων¹¹. Τα υπεροξειδία των λιπιδίων εκτός από τις τοξικές επιδράσεις στα κύτταρα και τη συσχέτισή τους με παθολογικές καταστάσεις, λαμβάνουν χώρα και στη οξειδοαναγωγική σηματοδότηση^{6,11,12}. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις αυξορρυθμίζουν γονίδια για την αντιοξειδωτική άμυνα του κυττάρου¹⁰.

1.3.4 Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες έχουν μια πολυδιάστατη σχέση με το οξειδωτικό στρες. Τα σάκχαρα μπορούν να αλληλεπιδράσουν με λιπίδια, νουκλεϊκά οξέα και πρωτεΐνες. Τα τελικά προϊόντα ονομάζονται τελικά προϊόντα προχωρημένης γλύκωσης (Advanced Glycation End products – AGE) και είναι μη ενζυμικά-τροποποιημένα μόρια¹³. Ο πιο σύνθητης σχηματισμός AGE είναι με τη διαδικασία της γλύκωσης πρωτεϊνών μέσω της αντίδρασης Maillard, σχηματίζοντας βάσεις Schiff¹³. Τα AGE προάγουν την παραγωγή ROS¹³. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει οξείδωση σακχάρων και κατ'επέκταση σπάσιμο της αλυσίδας του DNA ή του RNA, ή και την παραγωγή δραστικών καρβονυλίων⁵.

1.4 Οξειδοαναγωγή και σηματοδότηση

Η οξειδοαναγωγική κατάσταση σε κάθε σημείο διαφέρει, ακόμα και εντός του κυττάρου, σε διαφορετικά διαμερίσματα υπάρχει διαφορετική ισορροπία ή ανισορροπία οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών⁶. Έτσι, δεν μπορεί να αναφερθεί μια γενική κυτταρική οξειδοαναγωγική κατάσταση⁶. Οι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις μπορούν να ρυθμίσουν μεταγωγικά μονοπάτια (σε eustress) με τροποποίηση μεταγραφικών παραγόντων και με τροποποίηση ενζύμων⁶. Ένας κύριος τρόπος συμμετοχής της οξειδοαναγωγικής κατάστασης στη σηματοδότηση είναι η τροποποίηση, με οξειδωτικές διεργασίες, των πλευρικών αλυσίδων διαφόρων αμινοξέων των πρωτεϊνών, από H₂O₂⁶. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι βασική ένωση για την οξειδοαναγωγική σηματοδότηση⁶. Το H₂O₂ είναι μία ένωση που αντιδρά εύκολα με συγκεκριμένα κυστεϊνικά κατάλοιπα σε υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης και περοξυρεδοξίνες, ενώ με άλλες ενώσεις αντιδρά ελάχιστα και έτσι έχει την δυνατότητα να διασχίζει αποστάσεις ενδοκυτταρικά ώστε να φτάνει στους τελικούς του στόχους⁶. Τα πιο δραστικά αμινοξέα είναι η κυστεΐνη και η μεθειονίνη, οι οποίες περιλαμβάνουν θειολικές ομάδες⁶. Η οξείδωση των θειολών γίνεται με ποικίλλες αναστρέψιμες τροποποιήσεις, όπως είναι ο σχηματισμός δισουλφιδίων και S-γλουταθειονυλίωσης⁶. Οι θειόλες αντιδρούν και με ελεύθερες ρίζες. Θειολικές ρίζες και άλλες δραστικές μορφές θείου λαμβάνουν μέρος στη διαδικασία της σηματοδότησης⁶.

Η οξειδωτική τροποποίηση των θειολών των πρωτεϊνών προκαλεί αλλαγή στη στερεοδιάταξη και στη λειτουργία τους⁶. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν και σηματοδοτικό αλλά και άλλους λειτουργικούς

ρόλους⁶. Οι θειόλες που τροποποιούνται μπορεί να βρίσκονται σε κατάλοιπα κυστεΐνης ή μεθειονίνης. Σε φυσιολογικές καταστάσεις το 6-14% των καταλοίπων κυστεΐνης του προτεασώματος βρίσκεται σε οξειδωμένη κατάσταση⁶. Έτσι ρυθμίζονται διάφορα ένζυμα (επεξεργασίας mRNA) και πρωτεΐνες όπως ιμφορτίνες⁶. Η οξείδωση μεθειονινών μπορεί να ενεργοποιήσει ή να απενεργοποιήσει ένζυμα, με το τελευταίο να είναι πιο σύνηθες⁶.

Η οξείδωση των θειολών κυστεϊνικών καταλοίπων επάγει την ρύθμιση των κύριων διακοπών οξειδωαναγωγής στα κύτταρα, όπως είναι ο συσχετιζόμενος με τον προερχόμενο από τα ερυθροειδή πυρηνικό παράγοντα 2, παράγοντας 2 (Nuclear factor-Erythroid derived 2-related factor 2 – Nrf2), ο Πυρηνικός Παράγοντας - ενισχυτής της κ ελαφριάς αλύσου, των ενεργοποιημένων B-κυττάρων (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells – NF-κB¹⁴)⁶ και ο παράγοντας p53⁸. Από τους κύριους ρυθμιστές του Nrf2 είναι η πρωτεΐνη Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) της οποίας τα κυστεϊνικά κατάλοιπα οξειδώνονται, επιτρέποντας στον Nrf2 να εισαχθεί στον πυρήνα και να δράσει. Άλλος κύριος ρυθμιστής του Nrf2 είναι η αναγωγάση της θειορεδοξίνης 1 (Thioredoxin reductase 1 – TrxR1), η οποία είναι μία σεληνοπρωτεΐνη⁶. Ο Nrf2 επάγει αντιοξειδωτικά ένζυμα και ένζυμα αποτοξίνωσης⁶.

Ο NF-κB είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν σε διάφορες κυτταρικές διαδικασίες, όπως είναι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η απόπτωση, η απόκριση στο στρες ή γονίδια που συμμετέχουν στην εμβρυογένεση, την ανοσοποιητική απόκριση και άλλα^{6,14}. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να έχει έμμεση επίδραση στον NF-κB, αφού τροποποιούνται ρυθμιστές του ή και άμεση επίδραση, αφού σε περιπτώσεις αυξημένου οξειδωτικού στρες μπορούν να οξειδωθούν κυστεϊνικά κατάλοιπα του NF-κB. Το οξειδωτικό στρες ανάλογα το βαθμό στον οποίο υπάρχει και την κατάσταση του κυττάρου μπορεί να ενεργοποιεί ή να αναστέλλει τη δράση του μεταγραφικού αυτού παράγοντα, για παράδειγμα η οξείδωση της κυστεΐνης 62 (cys62) μειώνει τη σύνδεση του NF-κB στο DNA⁷.

Ο p53 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει την έκφραση οξειδοαναγωγικών γονιδίων, όπως το γονίδιο της GPx⁸. Ο p53 είναι ρυθμιστής της απόπτωσης από οξειδωτικό στρες⁵ και μπορεί να ενεργοποιηθεί έμμεσα (από άλλα μονοπάτια) και άμεσα από το οξειδωτικό στρες (βλάβη στο DNA, οξείδωση κυστεϊνών)^{8,15}. Σε χαμηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες ο p53 εκδηλώνει την αντιοξειδωτική του δράση που ευνοεί την επιβίωση του κυττάρου ενώ σε υψηλότερα επίπεδα δρα προοξειδωτικά ευνοώντας το θάνατο του κυττάρου¹⁶.

1.5 Ρύθμιση παθολογικών καταστάσεων

Υπάρχουν ποικίλες θεραπευτικές προσεγγίσεις που χρησιμοποιούν τα οξειδοαναγωγικά μονοπάτια και τη χημεία τους, με διαφορετικό τρόπο προκειμένου να αντιμετωπιστούν παθολογικές καταστάσεις. Έτσι, υπάρχουν οι προοξειδωτικές προσεγγίσεις και οι αντιοξειδωτικές προσεγγίσεις.

Οι προοξειδωτικές θεραπευτικές προσεγγίσεις στηρίζονται στην αύξηση του οξειδωτικού στρες, μερικές από αυτές είναι η ιονίζουσα ακτινοβολία, η χρήση κάποιων αντικαρκινικών φαρμάκων

και η θεραπεία βασιζόμενη σε οξειδωτικό στρες προκαλούμενο από φωτοοξείδωση (φωτοδυναμική θεραπεία)⁶.

Οι αντιοξειδωτικές προσεγγίσεις βασίζονται στη χορήγηση αντιοξειδωτικών και στη ρύθμιση μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται στα οξειδοαναγωγικά μονοπάτια⁶. Ένας σημαντικός στόχος φαρμάκων είναι το σύστημα Nrf2 - Keap1 και η επαγωγή στοιχείων αντιοξειδωτικής απόκρισης (Antioxidant Response Element – ARE) για τη θεραπεία των νόσων που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες¹⁷. Κάποια φάρμακα στοχεύουν στη ρύθμιση του συστήματος Nrf2 – Keap1, ενώ άλλα στοχεύουν στη ρύθμιση του παράγοντα Nrf2 σε συνδυασμό με τη ρύθμιση του NF-κB όπως γίνεται στην περίπτωση χορήγησης φουμαρικού διμεθυλεστέρα⁶. Ωστόσο, η χρήση των αντιοξειδωτικών θεραπειών πρέπει να γίνεται πολύ στοχευμένα, καθώς ανάλογα την περίπτωση μπορεί να διαφέρει το τελικό αποτέλεσμα. Για παράδειγμα, η ενεργοποίηση του Nrf2 χρησιμοποιείται για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης του καρκίνου, όμως η ενεργοποίηση του παράγοντα ευνοεί την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων⁶.

Ως θεραπευτικός στόχος έναντι του καρκίνου μελετάται και η στόχευση των θειολών του μεταγραφικού παράγοντα p53. Για τη ρύθμιση του p53 μελετώνται ενώσεις οι οποίες δρουν ως δέκτες της αντίδρασης Michael (δέκτες κατά Michael – Michael acceptor – MA) και μπορούν να ενεργοποιήσουν μεταλλαγμένες μορφές του p53, επαναφέροντας τη φυσιολογική του λειτουργία¹⁸.

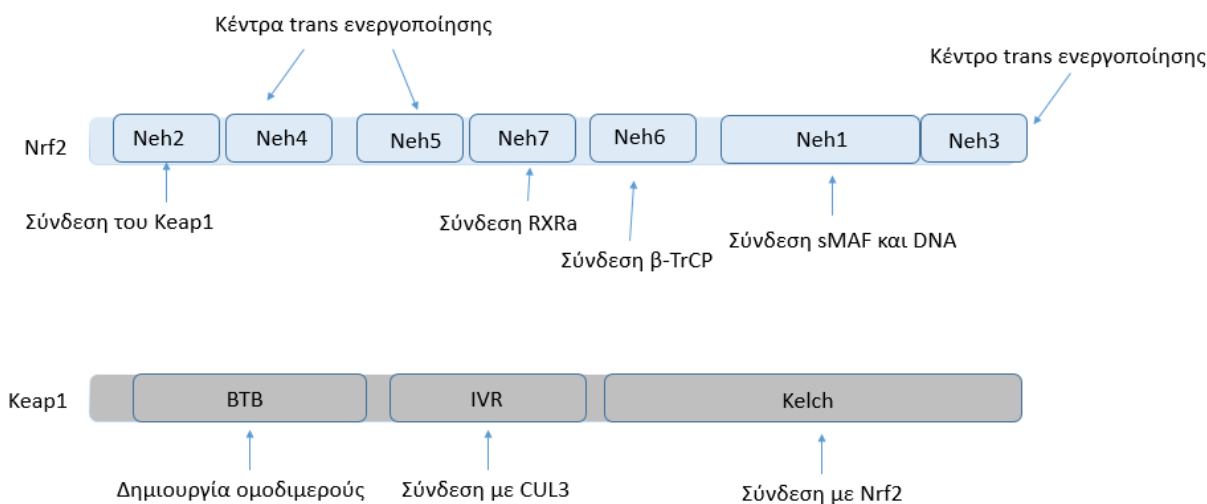
1.6 Nrf2 – Keap1

Ο Nrf2 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας (πρωτεΐνη 605 αμινοξέων¹⁹) της οικογένειας Cap 'n' Collar που ενεργοποιεί ένζυμα της φάσης II και είναι πρωτεΐνη κλειδί για την αντιοξειδωτική απόκριση του κυττάρου¹. Ο Nrf2 συμμετέχει στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης, του μεταβολισμού του κυττάρου, αλλά και της ενεργοποίησης της μετάστασης²⁰. Το σύστημα Nrf2-Keap1 προστατεύει τα βιομόρια από το οξειδωτικό στρες¹⁹. Η ταυτοποίηση της λειτουργίας του παράγοντα αυτού διεύρυνε το πεδίο και τους στόχους της τοξικολογίας¹.

Στον Nrf2 εντοπίζονται 7 συντηρημένα κέντρα (Εικόνα 4), τα Nrf2-ECH ομόλογα κέντρα (Nrf2-ECH homology - Neh). Στο πρώτο κέντρο (Neh1) εντοπίζεται η βασική περιοχή φερμουάρ λευκίνης (basic region-Leucine Zipper – bZIP). Ακολουθώς στο Neh2 υπάρχουν δύο περιοχές σημαντικές για την αποικοδόμηση (ντεγκρόνια – degrons), η DLG (D=Ασπαρτικό, L=Λευκίνη, G=Γλυκίνη) και ETGE (E=Γλουταμινικό, T=Θρεονίνη)¹⁹. Στο Neh2 προσδένεται και η πρωτεΐνη επαναλήψεων WD (WD Repeat - WDR23), που συμμετέχει στην ουβικουιτίνωση του Nrf2²¹. Τα κέντρα 3,4,5 συμβάλλουν στη δημιουργία μεταγραφικής συσκευής¹⁹ αλλά και στην ουβικουιτίνωση²¹. Στο κέντρο Neh6 βρίσκονται ακόμα 2 degrons, τα οποία επιτρέπουν την ουβικουιτίνωση από την E3 λιγάση ουβικουιτίνης β-TrCP (β-Transducin repeats-Containing Proteins = Πρωτεΐνες που περιέχουν επαναλήψεις της β-Τρανσντουσίνης)¹⁹. Το σύμπλοκο E3 λιγάσης β-TrCP – CUL1 ουβικουιτίνώνει τον Nrf2, όταν αυτός φωσφορυλιώνεται από την GSK3β

σε ένα μονοπάτι μεταγωγής που ρυθμίζεται από το μεταγωγικό μονοπάτι PI3K/Akt¹. Το κέντρο Neh7 συμμετέχει στην καταστολή του Nrf2¹⁹.

Η Keap1 είναι μία πρωτεΐνη της οικογένειας BTB-Kelch (BTB=Broad complex, tramtrack, bric-a-brac), ρυθμιστής του Nrf2, πλούσια σε θειόλες^{1,19}. Η Keap1 αποτελείται από 3 κέντρα, ένα κέντρο BTB, ένα Kelch και ένα κέντρο παρεμβάλουσας περιοχής (Intervening Region – IVR) (Εικόνα 4)¹⁹. Η Keap1 ομοδιμερίζεται μέσω αλληλεπιδράσεων που δημιουργούνται μεταξύ των BTB κέντρων. Έπειτα, ένα μόριο Nrf2 προσδένεται στο διμερές με αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κέντρων DLG και ETGE και του Kelch¹⁹. Επιπλέον, κάθε μία από τις δύο υπομονάδες αλληλεπιδρά μέσω του IVR κέντρου με την πρωτεΐνη CULLIN3 (CUL3) προς το σχηματισμό ενός ετεροτετραμερούς¹⁹. Με την τελευταία αλληλεπίδραση σχηματίζουν ένα σύμπλεγμα (E3) λιγάσης της ουβικουιτίνης. Τα συμπλέγματα για να σχηματιστούν χρειάζονται την Ring Box Protein (RBX)²⁰. Το σύμπλεγμα (E3) λιγάσης της ουβικουιτίνης που δημιουργείται ουβικουιτινώνει τον παράγοντα Nrf2 και αυτός οδηγείται στο 26S πρωτεάσωμα όπου αποικοδομείται^{1,19} (Εικόνα 5).

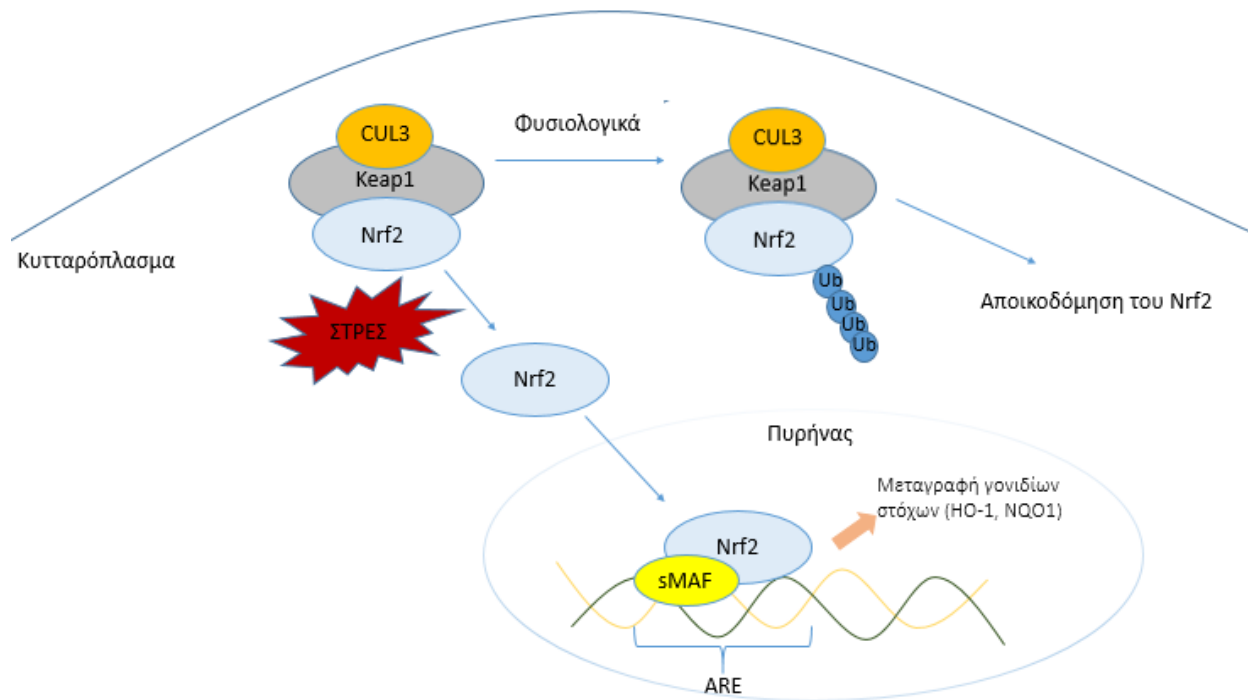


Εικόνα 4: Σχετική θέση και ρόλος των κεντρών των πρωτεϊνών Nrf2 και Keap1

Η Keap1 περιέχει κυστεΐνες, που είναι ευαίσθητες σε οξείδωση και ομοιοπολικές τροποποιήσεις από ηλεκτρόφιλα μόρια, και καθιστούν την Keap1 ευαίσθητη σε αλλαγές της κατάστασης οξειδωτικού στρες του κυττάρου¹⁹. Η ανθρώπινη Keap1 περιέχει 27 κυστεΐνες οι οποίες μπορούν να τροποποιηθούν σε οξειδωτικό στρες²². Η Keap1 δρα ως ανιχνευτής ελεύθερων ριζών και δραστικών μορφών μέσω των θειολών του. Επομένως, σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες ορισμένες κυστεΐνες της Keap1 υφίστανται τροποποίηση και απελευθερώνεται ο Nrf2, ο οποίος μεταφέρεται στον πυρήνα¹.

Στον πυρήνα ο Nrf2 αλληλεπιδρά μέσω της bZIP στην Neh1 με ένα μοτίβο bZIP μίας μικρής πρωτεΐνης του μυοαπονευρωτικού ινοσαρκώματος (small musculo-aponeurotic Fibrosarcoma

proteins– sMAF) και προσδένεται σε στοιχεία ARE. Έτσι επάγει την έκφραση ορισμένων μεταβολικών και κυτταροπροστατευτικών γονιδίων^{1,19} (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Ουβικουιτίνωση του Nrf2 υπό φυσιολογικές συνθήκες και αποικοδόμησή του. Ο Nrf2 ενεργοποιείται σε καταστάσεις στρες, εισέρχεται στον πυρήνα και με πρωτεΐνες sMAF προσδένεται στα ARE για την επαγωγή κυτταροπροστατευτικών γονιδίων²⁰.

Το σύστημα Nrf2/Keap1 σχετίζεται με διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Επαγωγείς του Nrf2 μελετώνται για την ρύθμιση νευροεκφυλιστικών νόσων, μεταβολικών νόσων, την προστασία ενάντια της καρκινογένεσης, της βλάβης από το κάπνισμα, την ακτινοβολία, την ισχαιμία και του θορύβου που μπορεί να προκαλέσει απώλεια ακοής¹. Διαφορετικές ενώσεις αλληλεπιδρούν με διαφορετικές κυστεΐνες. Κάθε κατάλοιπο κυστεΐνης επηρεάζει με συγκεκριμένο τρόπο την πρωτεΐνη στην οποία ανήκει. Επομένως, η τροποποίηση καταλοίπων κυστεΐνης μπορεί να έχει ποικίλους ρόλους, ανάλογα με την κατάσταση του κυττάρου^{19,20}. Συνεπώς, διαφορετικές ενώσεις μελετώνται για την επαγωγή του Nrf2. Οι περισσότεροι επαγωγείς είναι ηλεκτρόφιλες ενώσεις που τροποποιούν κυστεΐνες της Keap1¹⁹. Οι επαγωγείς μπορεί να δρουν μέσω παρεμπόδισης της πρόσδεσης της Cul3 στην Keap1 ή της ουβικουιτίνωσης του Nrf2 (αφού δεν ουβικουιτινώνεται, νεοσυντιθέμενα μόρια Nrf2 συσσωρεύονται ελεύθερα στο κυτταρόπλασμα) ή και μέσω ανταγωνισμού του Nrf2 για την πρόσδεση στο κέντρο Kelch¹⁹ ή και μέσω άλλων μεταγωγικών μονοπατιών²⁰. Οι ηλεκτρόφιλες ενώσεις είναι εκ φύσεως κυτταροτοξικές και σε μεγάλες συγκεντρώσεις προκαλούν τη θανάτωση του κυττάρου²⁰.

Τα τριτερπενοειδή αποτελούν τη μεγαλύτερη κατηγορία επαγωγέων του Nrf2. Για τη δράση των τριτερπενοειδών στον Keap1 φαίνεται πως σημαντικό ρόλο έχει η κυστεΐνη 151 (Cysteine 151, Cys151)²⁰. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, κάθε ένωση μπορεί να δρα σε διαφορετικό κατάλοιπο κυστεΐνης²⁰. Ωστόσο, η Cys151 φαίνεται να είναι σημαντική και από το γεγονός ότι

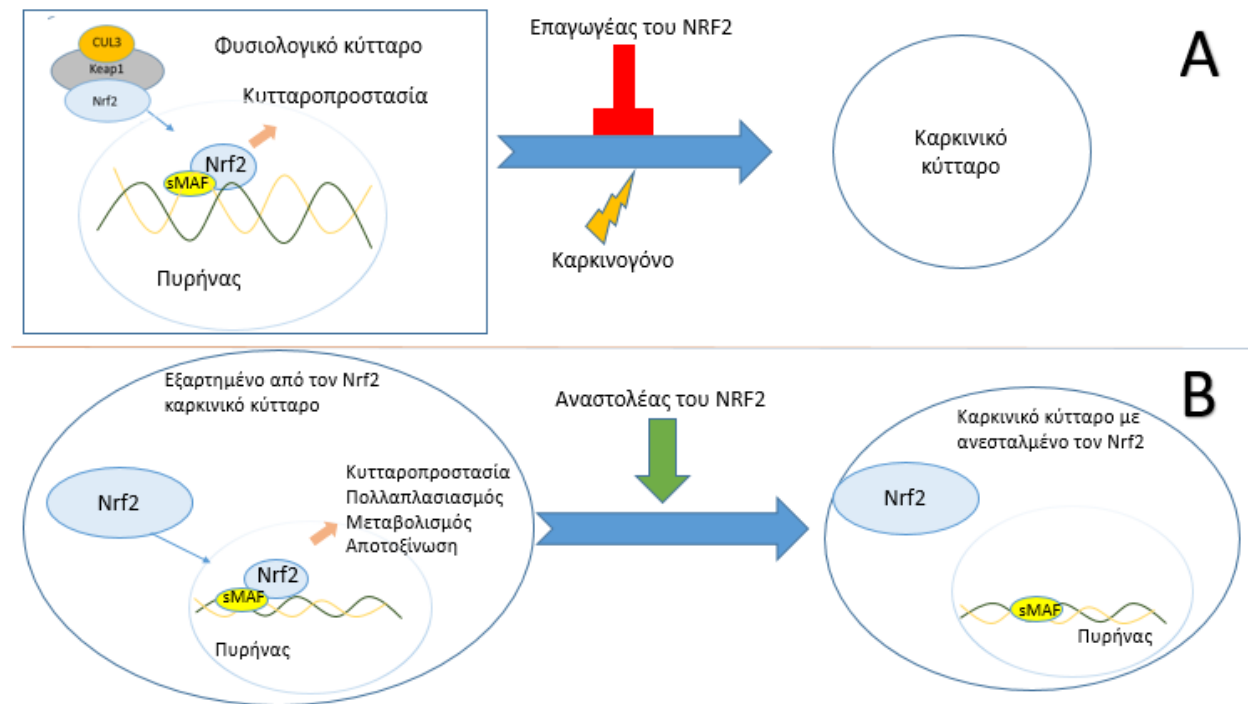
ομοιοπολική τροποποίηση του αμινοξέος αυτού ενισχύει την κυτταροτοξικότητα, ενώ η μη ομοιοπολική τροποποίηση δρα κυτταροπροστατευτικά²⁰. Άλλοι επαγωγείς του Nrf2 που μπορεί να προέρχονται από φυσικά προϊόντα είναι οι φαινολικές ενώσεις (όπως κουρκουμίνη και ρεσβερατρόλη) και διάφορες θειούχες ενώσεις όπως είναι η σουλφοραφάνη²⁰. Ποικίλλοι επαγωγείς του Nrf2 βρίσκονται σε στάδια κλινικών μελετών για τη θεραπεία νόσων, όμως δεν είναι πολλοί αυτοί που έχουν εγκριθεί²⁰. Ένας εγκεκριμένος επαγωγέας του Nrf2 από τον οργανισμό τροφίμων και φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών (U.S. Food and Drug Administration - FDA), είναι ο φουμαρικός διμεθυλεστέρας, ο οποίος χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της πολλαπλής σκλήρυνσης²⁰.

Υπάρχουν και ενδοκυτταρικοί ρυθμιστές-πρωτεΐνες του συστήματος Keap1-Nrf2. Για παράδειγμα, η φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη p62 ανταγωνίζεται την πρόσδεση του Nrf2 στην Keap1 και προωθεί την αποικοδόμηση της Keap1 και τη σταθεροποίηση του Nrf2¹. Ο Nrf2 εισέρχεται στον πυρήνα και αυξορρυθμίζει την έκφραση του p62 (θετική παλίνδρομη ρύθμιση), αλλά και την έκφραση της Keap1¹. Η ρύθμιση του Nrf2 μπορεί να γίνει με ρύθμιση της σταθερότητας της πρωτεΐνης, η οποία γίνεται κυρίως μέσω συμπλεγμάτων E3-λιγάσης όπως τα 3 που παρουσιάζονται παραπάνω, με ρύθμιση της μεταγραφής από παράγοντες όπως ο ίδιος ο Nrf2, ο Nf-κB, ο υποδοχέας αρυλ-υδρογονανθράκων (Aryl hydrocarbon Receptor – AhR)²¹. Τα επίπεδα Nrf2 ρυθμίζονται και σε επιγενετικό²² και μετα-μεταγραφικό επίπεδο, μέσω miRNAs και πρωτεϊνών που προσδέουν RNA (RNA-Binding Proteins – RBP)²¹. Η ρύθμιση της δράσης του Nrf2 γίνεται και μέσω της ρύθμισης άλλων παραγόντων, οι οποίοι ή ανταγωνίζονται τη ρύθμιση ενός γονιδίου στόχου όπως συμβαίνει με την περίπτωση του p53 (αναφέρεται στη συνέχεια) ή απαιτούνται για τη δημιουργία συμπλόκων με τον Nrf2 προκειμένου να ενεργοποιηθούν τα γονίδια στόχοι²¹.

Ένα γονίδιο στόχος που συνδυάζει τους δύο τελευταίους μηχανισμούς είναι το γονίδιο της οξυγενάσης-1 της αίμης (heme oxygenase-1 - *HO-1*), η οποία σχετίζεται με το μεταβολισμό της αίμης και του σιδήρου²¹. Η *HO-1* είναι ένα από τα γονίδια των οποίων η έκφραση προσδιορίστηκε στα παρακάτω πειράματα. Ο Nrf2 σε συνδυασμό με τον ενεργοποιητικό μεταγραφικό παράγοντα 4 (Activating transcription factor 4 – ATF4) αυξάνουν την έκφραση του γονιδίου της *HO-1*, ενώ ο μεταγραφικός παράγοντας ομολογίας BTB και CNC 1 (BTB and CNC homology 1 – BACH1) τη μειώνει. Ο BACH1 μειώνει επίσης την έκφραση της οξειδοαναγωγάσης1 NAD(P)H:Κινόνη (NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 – *NQO1*), ενώ το σύμπλοκο Nrf2-sMAF την αυξάνει²¹. Η *NQO1* συμμετέχει στην αναγωγή των κινονών²⁰. Ακόμη ένα από τα γονίδια που ρυθμίζονται από τον Nrf2 είναι το γονίδιο της καταλυτικής υπομονάδας της λιγάσης Γλουταμινικού-Κυστεΐνης (Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic subunit – *GCLC*)²³, συμμετέχει στη διαδικασία σύνδεσης Γλουταμινικού και Κυστεΐνης (σημαντικό βήμα για τη σύνθεση της Γλουταθειόνης)²⁴. Άλλο γονίδιο που ρυθμίζεται από τον Nrf2 είναι το μέλος 11 της οικογένειας 7 των διαλυτών μεταφορέων (Solute Carrier Family 7 Member 11 – *SLC7A11*), που εκφράζει τον αντιμεταφορέα κυστίνης-γλουταμινικού (Cystine/Glutamate antiporter – x-CT)²⁰ (σχετίζεται με την πρόσληψη κυστίνης²⁰). Παραδείγματα αντιοξειδωτικών ενζύμων που

ρυθμίζονται από τον Nrf2 αποτελούν η Θειορεδοξίνη (Thioredoxin – TRX, η Αναγωγή της Γλουταθειόνης (Glutathione Reductase 1 – GSR1), η Υπεροξειδάση της Γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase 1 – GPX1)²⁵.

Η φυσιολογική λειτουργία του Nrf2 είναι σημαντική για την υγεία των κυττάρων. Η ενεργοποίηση του Nrf2 ευνοεί την επιβίωση των κυττάρων και τη διαχείριση οξειδωτικού στρες και παθολογικών καταστάσεων. Ωστόσο αυτά τα οφέλη εμφανίζονται και σε καρκινικά κύτταρα στα οποία εντοπίζονται υψηλά επίπεδα ενεργότητας του Nrf2¹. Αυτά τα εξαρτώμενα από τον Nrf2 καρκινικά κύτταρα αποκτούν μεταλλάξεις που τους αυξάνουν την αντιοξειδωτική ικανότητα και τους επιτρέπουν τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και την αντοχή σε θεραπείες, μέσω της αυξημένης ενεργότητας του Nrf2^{1,20}. Συνεπώς, ο Nrf2 προστατεύει τα κύτταρα από την μετατροπή τους σε καρκινικά, όμως άπαξ και αρχίσει η καρκινογένεση, ο Nrf2 ευνοεί την επιβίωσή τους των καρκινικών πλέον κυττάρων^{1,20}. Σε καρκίνους που εξαρτώνται από τον Nrf2, μια πιθανή αποτελεσματική θεραπεία είναι η χρήση αναστολέων του Nrf2^{1,20} (Εικόνα 6). Οι αναστολές του Nrf2 μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ευαισθητοποίηση καρκινικών κυττάρων ανθεκτικών στις χημειοθεραπείες²⁰. Η αποτελεσματική ρύθμιση του Nrf2 εξαρτάται από το στάδιο, τον ιστό και το γενετικό υπόβαθρο του καρκίνου²⁰.



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης της ρύθμισης του Nrf2. Στην περίπτωση A ο επαγωγέας του Nrf2 εμποδίζει τη μετατροπή του φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό, υπό την επίδραση καρκινογόνου παράγοντα. Στην περίπτωση B ο αναστολέας του Nrf2 εμποδίζει τον Nrf2 από το να δράσει κυτταροπροστατευτικά στο εξαρτημένο από τον Nrf2 καρκινικό κύτταρο

Ενώ η μειωμένη λειτουργία του Nrf2 οδηγεί σε οξειδωτικό στρες, η υπερβολική λειτουργία του Nrf2 οδηγεί σε αναγωγικό στρες, το οποίο έχει και αυτό δυσμενείς επιπτώσεις¹.

1.7 Φυσικές ουσίες

Τα φυσικά προϊόντα προέρχονται από ζωντανούς οργανισμούς και παρουσιάζουν θεραπευτικές ιδιότητες σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις²². Στις πηγές των φυσικών προϊόντων υπάρχουν πρωτογενείς μεταβολίτες (απαραίτητοι για την επιβίωση και τη λειτουργία του οργανισμού) και δευτερογενείς μεταβολίτες που μπορεί να έχουν άλλους ρόλους όπως η άμυνα του οργανισμού²⁶. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες αναφέρονται ως φυσικά προϊόντα, είναι βιοδραστικοί και περιλαμβάνονται σε εκχυλίσματα²⁶. Οι θεραπευτικές ιδιότητες των φυσικών πηγών (κυρίως φυτών) έγιναν αντιληπτές από τα αρχαία χρόνια και έχουν βρεθεί σε αρχαίες επιγραφές από διάφορες περιοχές (σουμερικές, κινέζικες, αιγυπτιακές, ελληνικές)²⁶.

Τα φυσικά προϊόντα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την καταπολέμηση παθολογικών καταστάσεων που μπορεί να προέρχονται από το αυξημένο οξειδωτικό στρες²². Οι ιδιότητες αυτές οφείλονται στην πληθώρα χημικών ουσιών που εμπεριέχονται στα φυσικά προϊόντα²². Οι ουσίες αυτές χρησιμοποιούνται ως πρότυπα ή ως πηγές για την ανάπτυξη φαρμάκων²². Από τα φυσικά προϊόντα, τα φυτικά εκχυλίσματα χρησιμοποιούνται σε μεγάλο ποσοστό (49% μετά το 2000) από καρκινοπαθείς ως συμπληρωματική και εναλλακτική θεραπεία²⁷.

Διαφορετικές φυσικές ουσίες μπορούν να επηρεάσουν με διαφορετικό τρόπο το σύστημα Nrf2/Keap1²². Έτσι, η ρουτίνη (φλαβονοειδές), η ξανθοχουμόλη (χαλκόνη), η βιθαφερίνη Α (στεροειδής λακτόνη) δρουν αλληλεπιδρώντας με τις κυστεΐνες του Keap1²². Η γαλλική επιγαλλοκατεχίνη (κατεχίνη) δρα παρεμποδίζοντας τις αλληλεπιδράσεις Nrf2-Keap1²². Η δράση της κουερσετίνης (φλαβονόλη) μπορεί να εμφανιστεί μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων²². Άλλες ουσίες δρουν σε άλλα μεταγωγικά μονοπάτια επηρεάζοντας τον Nrf2, όπως η μεθυλενογενόλη (Φαινυλοπροπανοειδές) δρα μέσω επιρροής της φωσφορυλίωσης της GSK3β²².

Τα φυσικά προϊόντα διερευνώνται και για την αντικαρκινική και αντιφλεγμονώδη δράση τους²⁸. Η δράση αυτή μπορεί να εκδηλώνεται μέσω αλληλεπίδρασης με διάφορους παράγοντες όπως είναι ο p53 και ο NF-κB²⁸.

Στη παρούσα εργασία τα φυσικά προϊόντα που μελετήθηκαν ήταν η πρόπολη (Propolis) και τα εκχυλίσματα των φυτών: βιθάνια (*Withania somnifera*), βοσβελία η ιερή (*Boswellia sacra*), γαϊδουράγκαθο (*Silybum marianum*), δεντρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*), ελιά (*Olea europaea*), ευφρασία (*Euphrasia officinalis*), θυμάρι (*Thymus vulgaris*), καλέντουλα (*Calendula officinalis*), κυνόροδο (*Rosa canina L.*), λευκό μούρο (*Morus alba*), μορίνγκα (*Moringa oleifera*), ρίγανη (*Origanum vulgare*), ροδιόλα (*Rhodiola rosea*), σπαθόχορτο (*Hypericum perforatum*), τσάι του βουνού (*Sideritis scardica*), φασκόμηλο (*Salvia officinalis*), μαύρο φραγκοστάφυλλο (*Ribes nigrum*), χαμομήλι (*Matricaria chamomilla*).

Φυσικό Προϊόν	Λατινική ονομασία	Οικογένεια
Βιθάνια	<i>Withania somnifera</i>	<i>Solanaceae</i>
Βοσβέλια	<i>Boswellia sacra</i>	<i>Burseraceae</i>
Γαϊδουράγκαθο	<i>Silybum Marianum</i>	<i>Asteraceae</i>
Δεντρολίβανο	<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Lamiaceae</i>
Ελιά	<i>Olea europaea</i>	<i>Oleaceae</i>
Ευφρασία	<i>Euphrasia officinalis</i>	<i>Orobanchaceae</i>
Θυμάρι	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Lamiaceae</i>
Καλέντουλα	<i>Calendula officinalis</i>	<i>Asteraceae</i>
Κυνόροδο	<i>Rosa canina</i>	<i>Rosaceae</i>
Λευκό Μούρο	<i>Morus alba</i>	<i>Moraceae</i>
Μορίνγκα	<i>Moringa oleifera</i>	<i>Moringaceae</i>
Πρόπολη	-	-
Ρίγανη	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Lamiaceae</i>
Ροδιόλα	<i>Rhodiola rosea</i>	<i>Crassulaceae</i>
Σπαθόχορτο	<i>Hypericum perforatum</i>	<i>Hypericaceae</i>
Τσάι του Βουνού	<i>Sideritis scardica</i>	<i>Lamiaceae</i>
Φασκόμηλο	<i>Salvia officinalis</i>	<i>Lamiaceae</i>
Μαύρο Φραγκοστάφυλλο	<i>Ribes nigrum</i>	<i>Grossulariaceae</i>
Χαμομήλι	<i>Matricaria chamomilla</i>	<i>Asteraceae</i>

Πίνακας 1: Παρουσιάζονται τα φυσικά προϊόντα που χρησιμοποιήθηκαν με τις επίσημες λατινικές ονομασίες τους και την οικογένεια στην οποία ανήκουν.

1.7.1 Βιθάνια



Εικόνα 7: Βιθάνια σε μορφή σκόνης

Η *W. somnifera* (Εικόνα 7) έχει μελετηθεί σε κλινικές και σε προκλινικές μελέτες για τη θεραπεία νευρολογικών διαταραχών, ηπατοτοξικότητας, υπερλιπιδαιμίας²⁹. Παραδοσιακά χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του πόνου, καρδιαγγειακών νόσων, μολύνσεων του αναπνευστικού, έλκων και άλλων προβλημάτων²⁹. Μερικές από τις φαρμακευτικές ιδιότητες που της έχουν προσδωθεί είναι: αντιμικροβιακή, καρδιοπροστατευτική, παρασιτοκτόνα, αντιφλεγμονώδης, αντικαρκινική, κυτταροτοξική, αντιοξειδωτική, προσαρμογόνα²⁹. Μελετάται η χρήση του ως αντίδοτο σε δηλητηριάσεις από αρσενικό και από δηλητήριο φιδιών²⁹. Περιέχει σαπωνίνες, φλαβονοειδή, στεροειδείς λακτόνες (βιθανολίδες), σε ψηλό ποσοστό αλκαλοειδών εντοπίζονται οι βιθανίνες²⁹. Επιπλέον, έχουν προσδιοριστεί στο φυτό αυτό και φαινολικά, πολυφαινόλες, στερεοειδή, γλυκοσίδες. Οι βιθανολίδες συμβάλλουν σημαντικά στην αντικαρκινική ιδιότητα του φυτού²⁹. Η βιθαφερίνη Α (Withaferin A – WA) (βιθανολίδη) είναι δέκτης αντίδρασης Michael και προσδέεται ομοιοπολικά σε πρωτεΐνες³⁰. Η WA έχει προσδιοριστεί ως ρυθμιστής του μονοπατιού Nrf2, αφού ανάλογα το στάδιο της νόσου ο Nrf2 αυξορρυθμίζεται ή μειορρυθμίζεται³⁰. Επιπλέον η WA αναστέλλει το μονοπάτι του NF-κΒ³⁰. Αιθανολικό (95%) εκχύλισμα βιθάνιας αυξορρυθμισε τον Nrf2 σε αθανατοποιημένα αστροκύτταρα αρουραίου της σειράς (DI TNC1)³¹.

1.7.2 Βοσβελία η ιερή

Από τη βοσβελία (Εικόνα 8) απομονώνεται το ρετσίνι της, γνωστό και ως λιβάνι³². Το λιβάνι έχει πολλές χρήσεις όπως σε καλλυντικά, φαρμακευτικά ή ακόμη και σε τρόφιμα ποτά³². Διαθέτει πλούσιο άρωμα και είναι ένα από τα παραδοσιακά θεραπευτικά προϊόντα της Μέσης Ανατολής³². Χρησιμοποιείται ως ηπατοπροστατευτικό, αντιπηκτικό, αντιφλεγμονώδες, αντιοξειδωτικό και για τη θεραπεία διαφόρων διαταραχών³². Το λιβάνι περιέχει βιοδραστικές ουσίες, από τις οποίες η πιο σημαντική για τις φαρμακευτικές του ιδιότητες είναι τα βοσβελικά οξέα (τερπενοειδή)³². Η δράση των βοσβελικών οξέων έχει μελετηθεί σε διάφορα είδη καρκίνου και ασθενειών³³. Έτσι διάφορα είδη βοσβελικών οξέων βρέθηκαν να επηρεάζουν τον p53 και τον Nrf2³³. Συγκεκριμένα, ο Nrf2 αυξορρυθμίστηκε σε περιπτώσεις εγκεφαλικής βλάβης λόγω ισχαιμίας-επαναιμάτωσης με τη χορήγηση βοσβελικών οξέων (AKBA – 3-O-acetyl-11-keto-β-boswellic acid)³³. Με τα αιθέρια έλαια του *B. sacra* κατορθώθηκε η θανάτωση μεταστατικών καρκινικών κυττάρων με ανοχή στα φάρμακα, σε μια περίπτωση καρκίνου του μαστού³⁴.



Εικόνα 8: Βοσβελία σε μορφή σκόνης

1.7.3 Γαϊδουράγκαθο



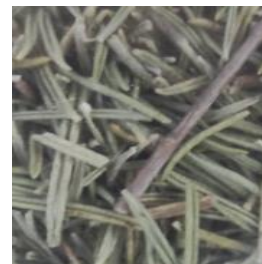
Εικόνα 9: Φύλλο Γαϊδουράγκαθου

Το γαϊδουράγκαθο (Εικόνα 9) χαρακτηρίζεται από αντιοξειδωτικές και αντιβακτηριδιακές ιδιότητες³⁵. Παραδοσιακά χρησιμοποιούνταν εκχυλίσματα φύλλων και άνθων γαϊδουράγκαθου για νοσήματα του σπλήνας, του ήπατος και της ουροδόχου κύστης³⁶. Τον τελευταίο αιώνα παρατηρήθηκαν οι φαρμακευτικές ιδιότητες των σπόρων και των καρπών του γαϊδουράγκαθου³⁶.

Από το γαϊδουράγκαθο απομονώνεται με εκχύλιση ένα μείγμα флаβονολιγνάνων, που ονομάζεται silymarin που χρησιμοποιείται για τις φαρμακευτικές του ιδιότητες έναντι νευροεκφυλιστικών, καρδιαγγειακών και ηπατικών προβλημάτων, καθώς και σε περιπτώσεις καρκίνου^{35,37}. Το silymarin περιέχει ένα πολυφαινολικό μείγμα με silybin, isosilybin, silydianin, silychristin ως κύρια συστατικά³⁷. Το silymarin μπορεί να απομονωθεί από όλα τα μέρη του φυτού όμως τα συστατικά του εμπεριέχονται σε μεγαλύτερο ποσοστό στους σπόρους και στους καρπούς³⁸. Οι σπόροι του γαϊδουράγκαθου περιλαμβάνουν πολλά флаβονοειδή, στερόλες, τοκοφερόλη, λιπαρά οξέα³⁹ και σε μεγάλο ποσοστό τις 4 κύριες ουσίες του silymarin³⁷. Το silymarin χορηγείται υπό μορφή καψουλών και δεν εμφανίζει έντονη τοξικότητα³⁷. Το silymarin εκτός από τη μείωση των ROS και των επιδράσεων τους στο κύτταρο, ενεργοποιεί τον Nrf2 ενώ αναστέλλει τον NF-κB³⁷. Αντιοξειδωτική δράση παρουσιάζουν εκχυλίσματα από σπόρους, άνθη και φύλλα του φυτού⁴⁰.

1.7.4 Δεντρολίβανο

Το *R. officinalis* (Εικόνα 10) χρησιμοποιείται στη μαγειρική, στη συντήρηση τροφίμων, ως διακοσμητικό χώρου, αλλά και ως θεραπευτικό βότανο⁴¹. Μερικές από τις φαρμακευτικές του χρήσεις είναι για τη μείωση της πίεσης του αίματος, την καταπολέμηση της κόπωσης και της κατάθλιψης, τον έλεγχο του άσθματος, του καταρράκτη και άλλων παθήσεων, την καταπολέμηση φλεγμονών και οξειδωτικού στρες, τη χαλάρωση των μυών και τη μείωση αλλεργικών καταστάσεων του δέρματος⁴¹. Είναι επίσης αντιμικροβιακό, αντιϊκό, αντικαρκινικό, ηπατοπροστατευτικό και νεφροπροστατευτικό⁴¹. Μερικές από τις φυτοχημικές ενώσεις που περιέχονται είναι το καφεϊκό οξύ, το ροσμαρινικό οξύ, η καρνοσόλη, η απιγενίνη, το ουρσολικό οξύ (αναστέλλει τον NF-κB), το ολεανολικό οξύ, παράγωγα ευγενόλης⁴¹. Το δεντρολίβανο αυξορρυθμίζει τον Nrf2⁴¹.



Εικόνα 10: Δεντρολίβανο

1.7.5 Ελιά



Εικόνα 11: Φύλλα ελιάς

Η ελιά άρχισε να ερευνάται για τις φαρμακευτικές της ιδιότητες από τότε που ανακαλύφθηκε πως εκχυλίσματά της βοηθούν για την καταπολέμηση του πυρετού από ελονοσία⁴². Αργότερα χρησιμοποιήθηκε για τη ρύθμιση αρρυθμιών, πίεσης του αίματος και μυϊκών σπασμών⁴². Τα φύλλα της *O. europaea* (Εικόνα 11) είναι πλούσια σε φλαβονοειδή όπως ρουτίνη, απιγενίνη και σε χαλκόνες⁴³. Περιέχονται επίσης πολυφαινόλες και καροτενοειδή, ενώ εντοπίζεται και μια ειδική κατηγορία τερπενοειδών, τα σκεοϊριδοειδή (τροποποιημένα ιριδοειδή), όπως η ολεοκανθάλη (επάγει την απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα)⁴². Εντοπίζονται και τριτερπένια όπως το ολεανολικό οξύ (σχετίζεται με την επαγωγή του προαποπτωτικού μονοπατιού του p53)⁴². Σε πειράματα με αρουραίους εκχύλισμα φύλλων *O.europaea* μείωσε την νεφροτοξικότητα που προκαλείται από την κυκλοφωσφαμίδη (αλκυλιωτικός παράγοντας – αντικαρκινικό) μέσω αυξορρύθμισης του Nrf2 και μειορρύθμισης του NF-κΒ⁴³.

1.7.6 Ευφρασία

Η *E. officinalis* (Εικόνα 12) είναι ένα φυτό με πολλές ιδιότητες⁴⁴. Μερικές από τις δράσεις του είναι: αντιφλεγμονώδης, αντικαρκινική, αντιοξειδωτική, αντικαταρροϊκή, αντιεπιληπτική, ηπατοπροστατευτική, αντιμικροβιακή, αντιϊκή⁴⁴. Χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση οφθαλμικών παθήσεων και αλλεργικών συμπτωμάτων⁴⁴. Στα εκχυλίσματά της συναντώνται φαινολικά οξέα (ένα από τα οποία είναι το καφεϊκό οξύ⁴⁵), φλαβονοειδή (για παράδειγμα ρουτίνη⁴⁵), αιθέρια έλαια και ιριδοειδή (κατηγορία μονοτερπενίων)⁴⁴. Η *E. officinalis* ρυθμίζει το μονοπάτι ενεργοποίησης της μεταγραφής του NF-κΒ και οδηγεί σε μείωση της φλεγμονής⁴⁵.



Εικόνα 12: Τρίμμα Ευφρασίας

1.7.7 Θυμάρι



Εικόνα 13: Θυμάρι

Το *T. vulgaris* (Εικόνα 13) είναι ένα φυτό με έντονη μυρωδιά⁴⁶. Χρησιμοποιείται στην αρωματοποίηση, στα καλλυντικά και ως μπαχαρικό στα φαγητά⁴⁶. Έχει επίσης φαρμακευτικές ιδιότητες και χρησιμοποιείται στη διαχείριση πληγών⁴⁶. Εμφανίζει αντιφλεγμονώδη, αναλγητική, αντιμικροβιακή, αντιπυρετική και αντιοξειδωτική δράση⁴⁷. Περιέχει φαινολικά οξέα (καφεϊκό, κουμαρικό, ροσμαρινικό κ.α.) τερπενοειδή (όπως θυμόλη, καρβακρόλη, γερανιόλη), φλαβονοειδή (μερικά από τα οποία είναι: απιγενίνη, ξανθομικρόλη)⁴⁶. Το *T. vulgaris* ενεργοποιεί τον Nrf2 ενισχύοντας τις αντιοξειδωτικές του ικανότητες⁴⁷.

Πιθανόν είναι στην ενεργοποίηση αυτή να συμβάλει και το πλούσιο περιεχόμενο σε ροσμαρινικό οξύ⁴⁷, το οποίο έχει την ικανότητα να διαταράσσει τη σύνδεση του Nrf2 με τον Keap1⁴⁸. Η καρβακρόλη, η γερανιόλη και η θυμόλη είναι επαγωγείς του Nrf2⁴⁹⁻⁵¹.

1.7.8 Καλέντουλα

Η καλέντουλα (Εικόνα 14) χρησιμοποιείται για τις φαρμακευτικές της ιδιότητες, ως αντιφλεγμονώδες και αντισπασμωδικό, καθώς και για τη θεραπεία πληγών, εγκαυμάτων και άλλων τραυμάτων²⁷. Είναι διαδεδομένη σε κρέμες και καλλυντικά, με ελάχιστη τοξικότητα στον άνθρωπο και λίγες μόνο αναφορές αλλεργιών²⁷. Σε διάφορα εκχυλίσματα της καλεντούλας έχουν αποδοθεί ιδιότητες όπως αντιϊκή, αντιμυκητιακή, αντικαρκινική, αντιβακτηριδιακή, αντιοξειδωτική, ανοσοδιεγερτική, αντιφλεγμονώδης και άλλα²⁷. Η ιδιότητα κάθε εκχυλίσματος



Εικόνα 14: Άνθος της Καλέντουλα

εξαρτάται από το σύνολο των δευτερογενών μεταβολιτών (όπως τερπενοειδή, φαινολικά οξέα, καρροτενοειδή, κουμαρίνες, κινόνες, φλαβονοειδή) που περιλαμβάνονται²⁷. Η αντικαρκινική ιδιότητα έχει χαρακτηριστεί και *in vitro* σε καρκινικές κυτταρικές σειρές και *in vivo*²⁷. Η κυτταροτοξική δράση *in vitro* έχει αποδοθεί κυρίως σε 3 βιοδραστικές ουσίες: τη λουτεΐνη (η οποία αυξορρυθμίζει τον p53) και Calendulose F 6'Ο-n-butyl ester και calendulose G 6'Ο-n-methyl ester²⁷. Η κυτταροτοξικότητα αυτή εμφανίζεται σε εκχυλίσματα και άνθεων και ριζών²⁷.

1.7.9 Κυνόροδο

Οι καρποί του γένους *Rosa* έχουν χρησιμοποιηθεί κατά κόρον στο πέρασμα των χρόνων για τις θεραπευτικές τους ιδιότητες. Από τα πιο δημοφιλή είδη είναι το *R. canina*⁵² (Εικόνα 15). Τα διάφορα είδη του γένους χρησιμοποιούνται αναλόγως την κουλτούρα για διαφορετικούς λόγους. Έτσι τα φυτά αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί ως αντιδιαρροϊκά, διουρητικά, για τη θεραπεία της νεφρολιθίασης, ως αντιϊκά⁵². Η χρήση τους ποικίλλει από τη δημιουργία σιροπιών και αλεύρων ως την κατάποση των εκχυλισμάτων τους σε μορφή τσαγιού και την παραγωγή αλοιφών⁵².



Εικόνα 15: Κυνόροδο

Τα έλαια από διάφορα είδη άγριου τριαντάφυλλου (*Rosa mosqueta*) έχουν κυτταροπροστατευτική, ηπατοπροστατευτική, αντιφλεγμονώδη, αντιδιαβητική και αντιοξειδωτική και άλλες δράσεις⁵³. Το *Rosa rubiginosa* εκδηλώνει τις δράσεις αυτές καθώς επάγει και την ενεργοποίηση του Nrf2, οι δράσεις αυτές πιθανώς οφείλονται στο υψηλό περιεχόμενο λιπαρών οξέων ω-3 (όπως ω-3 α-λινολενικό οξύ), στις τοκοφερόλες και σε άλλα μόρια⁵³. Στο γένος *Rosa* τα φυτά έχουν σε μεγάλη συγκέντρωση τα λιπαρά οξέα: α-λινολενικό, παλμιτικό και λινολεϊκό, επίσης τα φυτά της κατηγορίας άγριων τριαντάφυλλων περιέχουν διάφορα μέταλλα και ιχνοστοιχεία καθώς και βιταμίνες⁵². Έχουν προσδιοριστεί επίσης πολλοί δευτερογενείς μεταβολίτες συμπεριλαμβανομένων φαινολικών οξέων, ταννινών, ανθοκυανινών, φλαβονολών, φλαβονοειδών⁵². Στο *R. canina* έχουν βρεθεί μεταξύ άλλων το γαλλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, σαλικυλικό οξύ, κουερσετίνη και διάφορα παράγωγα της, επικατεχίνη, λουτεΐνη και καροτένια⁵², ρουτίν, απιγενίνη καθώς και πολλές ακόμα ουσίες⁵⁴. Σε εκχύλισμα *R. canina* με διμεθυλοσουλφοξείδιο (Dimethyl Sulfoxide – DMSO) και 1% οξικό οξύ οι πιο άφθονες

φαινολικές ουσίες ήταν το ασκορβικό οξύ και το κουμαρικό⁵⁴. Περιλαμβάνονται ουσίες που έχουν αποδειχθεί πως ρυθμίζουν τη λειτουργία του Nrf2.

Το *R. canina* έχει επιδείξει προστατευτικές ιδιότητες έναντι γαστρεντερικών ελκών, σχηματισμού νεφρικών λίθων, της ηπατικής βλάβης⁵². Έχει νευροπροστατευτικές ιδιότητες, είναι πιθανό αντιδιαβητικό, χρησιμοποιείται για την διατήρηση της υγείας του δέρματος και μειώνει την εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων⁵². Είναι αντιοξειδωτικό, αντιφλεγμονώδες, με πιθανές αντικαρκινικές ιδιότητες και χρησιμοποιείται ως θεραπεία-αναλγητικό σε περιπτώσεις αρθρίτιδας. Η τοξικότητα που έχει παρατηρηθεί κατά τη χρήση του φυτού αυτού είναι ελάχιστη, με 2 περιπτώσεις δερματίτιδας και περιπτώσεις γαστρεντερικών ενοχλήσεων⁵².

1.7.10 Λευκό μούρο

Από τα γνωστά είδη μούρων, το λευκό μούρο (Εικόνα 16) είναι ένα από τα πιο ισχυρά όσον αφορά τις φαρμακευτικές ιδιότητες⁵⁵. Τα μούρα καταναλώνονται αυτούσια ή ως χυμός, φρούτα, κρασί, τσάι αλλά και υπό μορφή άλλων προϊόντων⁵⁵. Χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία νόσων ήπατος και νεφρών, την αντιμετώπιση κόπωσης, αδυναμίας, αναιμίας⁵⁵. Στις ιδιότητές τους περιλαμβάνονται η αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδης, υπολιπιδαιμική, αντιδιαβητική. Περιλαμβάνουν πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λιπαρά οξέα⁵⁵. Εντοπίζονται βιταμίνες του συμπλέγματος Β, και οι βιταμίνες Α, C, E, Κ⁵⁵. Περιέχουν φλαβονοειδή (ρουτίνη, κουερσετίνη, επιγαλοκατεχίνη κ.α.), φαινολικά οξέα (για παράδειγμα καφεϊκό οξύ)⁵⁵. Το εκχύλισμα των φρούτων *M. alba* έχει αντικαρκινικές ιδιότητες και σε ποντίκια με επαγόμενο καρκίνωμα ασκίτη Ehrlich παρουσίασε αποπτογόνο δράση με επαγωγή του p53 και μειορρύθμιση του NFκΒ⁵⁵. Εκχύλισμα πολυσακχαριτών του *M.alba* είχε ηπατοπροστατευτική δράση έναντι της ηπατοτοξικότητας από παλμιτικό οξύ (λιποτοξικότητα), σε κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (Hepatocellular Carcinoma – HepG2)⁵⁶. Η ηπατοπροστατευτική δράση προσδώθηκε στην ικανότητα του εκχυλίσματος να επάγει τον Nrf2⁵⁶.



Εικόνα 16: Αποξηραμένα Λευκά μούρα

1.7.11 Μορίνγκα

Η *M. oleifera* (Εικόνα 17) είναι ένα φαρμακευτικό φυτό που χρησιμοποιείται εδώ και χρόνια στη θεραπεία παθήσεων οξείας και χρόνιας διάρκειας όπως καρκίνος, διαβήτης, αρθρίτιδα⁵⁷. Το φυτό αυτό είναι βρώσιμο με αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δράση⁵⁷. Είναι γνωστός επαγωγέας του Nrf2 και περιέχει βιοδραστικές ουσίες όπως σαπωνίνες, φλαβονοειδή, τερπενοειδή, ταννίνες⁵⁸. Οι σπόροι και τα φύλλα του περιέχουν ισοθειοκυανικά, τα οποία αυξάνουν τη δράση του Nrf2, ενώ κάποια όπως το ισοθειοκυανικό οξύ 1 της μορίνγκας (Moringa isothiocyanate 1 – MIC1) αναστέλλουν παράλληλα και τη δράση του NF-κΒ⁵⁷. Το MIC1 εκτός του γεγονότος ότι είναι ένα από τα πιο



Εικόνα 17: Μορίνγκα σε μορφή σκόνης

βιοδραστικά ισοθειοκυανικά της μορίγγκας είναι και αρκετά σταθερό λόγω της σύνδεσής του με το σάκχαρο⁵⁹. Τα φύλλα περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις φαινολικών οξέων⁵⁸. Η μορίγγκα παρουσιάζει τις αντιοξειδωτικές της δράσεις και με άλλους τρόπους, όπως μέσω ρύθμισης του μονοπατιού Σιρτουίνης 1, η οποία παίζει ρόλο στην οξειδοαναγωγή, στη βιογένεση μιτοχονδρίων και στη ρύθμιση του Nrf2⁵⁸.

1.7.12 Πρόπολη



Εικόνα 18: Πρόπολη

Η πρόπολη (Εικόνα 18) είναι ένα κολλώδες προϊόν της μέλισσας που αποτελείται κυρίως από ρητίνες, βάλσαμο, αιθέρια έλαια, μελισσοκέρι και γύρη και χρησιμοποιείται από τη μέλισσα για τη δόμηση της κυψέλης της⁶⁰. Η πρόπολη περιέχει ενώσεις με ιατρικές δράσεις όπως αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική, ανοσοδιεγερτική, αντικαρκινική⁶⁰. Το προϊόν αυτό ανάλογα την περιοχή από την οποία προέρχεται έχει διαφορετική σύσταση⁶⁰. Συνήθως όταν προέρχεται από περιοχές με εύκρατο κλίμα, οι μέλισσες τη συλλέγουν από φυτά του γένους *Populus* και είναι πλούσια σε φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα και τους εστέρες τους⁶⁰.

Η μεσογειακή πρόπολη προέρχεται από υπο-τροπικές περιοχές και έχει αυξημένα διτερπένια⁶¹. Σε αιθανολικά εκχυλίσματα πρόπολης από Ελλάδα και Κύπρο εντοπίστηκαν τερπένια, ανθρακινόνες, φλαβονοειδή (απιγενίνη, κουερσετίνη κ.α.), φαινολικές ενώσεις (βανιλίνη, βανιλικό οξύ, καφεϊκό οξύ κ.α.) και τα δείγματα πρόπολης από την περιοχή της Καρδίτσας είχαν υψηλό περιεχόμενο πολυφαινολών συγκριτικά με τις υπόλοιπες περιοχές σε εκείνη τη μελέτη⁶⁰. Το προϊόν πρόπολης από τροπικά κλίματα προέρχεται από διαφορετικά φυτά, έχει άλλη σύσταση και είναι πλούσια σε βενζοφαινόνες, διτερπένια και φλαβονοειδή⁶⁰. Ωστόσο σε τροπικές ζώνες η σύσταση της πρόπολης ποικίλλει αρκετά και υπάρχουν διαφορετικοί τύποι πρόπολης, στη Βραζιλία για παράδειγμα προκύπτουν 13 τύποι πρόπολης⁶¹. Μελέτη έδειξε πως το αιθανολικό εκχύλισμα κόκκινης πρόπολης Βραζιλίας επάγει το μονοπάτι του Nrf2, με συσσώρευση του Nrf2 στον πυρήνα, σε κύτταρα ανθρώπινου εμβρυονικού νεφρού (Human embryonic kidney cells – HEK-293)⁶². Στην ίδια εργασία το αιθανολικό εκχύλισμα βραζιλιάνικης πρόπολης οδήγησε σε αυξορρύθμιση του Nrf2 στο ήπαρ, όταν αυτό χορηγήθηκε *per os* σε ποντίκια, για μία εβδομάδα⁶². Με την επαγωγή του Nrf2 έχουν συσχετιστεί και η πράσινη βραζιλιάνικη πρόπολη και το αιθανολικό εκχύλισμα κινέζικης πρόπολης⁶¹.

1.7.13 Ρίγανη



Εικόνα 19: Ρίγανη

Η *O. vulgare* (Εικόνα 19) χρησιμοποιείται ως συστατικό κατά τη μαγειρική για να προσδώσει γεύση και μυρωδιά στο φαγητό⁷⁸. Ωστόσο, έχουν παρατηρηθεί και θεραπευτικές ιδιότητες από το φυτό αυτό. Παραδοσιακά χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση διαφόρων παθήσεων όπως αναπνευστικών, ουροποιητικών, για κατευνασμό του πόνου της κοιλιακής χώρας και χορηγείται μέσω εισπνοής των πτητικών ενώσεων, μέσω

κατάποσης ή ως αλοιφή, επιδερμικά⁷⁸. Οι ιδιότητές του περιλαμβάνουν την αντιβακτηριδιακή, αντιμυκητιακή, αντιϊκή, αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική δράση^{63,64}. Η αντιβακτηριδιακή δράση διερευνήθηκε σε κλινικές μελέτες όπου εντοπίστηκε μείωση βακτηριακής μόλυνσης πληγών⁷⁸. Οι δράσεις του φυτού οφείλονται στο πλούσιο προφίλ δευτερογενών μεταβολιτών, οι οποίοι μπορεί να είναι λιπόφιλοι ή υδρόφιλοι⁷⁸. Στη μορφή του αιθέριου ελαίου βρίσκονται διάφορες πτητικές βιοδραστικές ουσίες όπως μονοτερπένια (καρβακρόλη, θυμόλη) και διτερπένια, (γερανιόλη)⁷⁸. Στις μη πτητικές ουσίες περιλαμβάνονται φαινολικά οξέα (με κύριο το ροσμαρινικό οξύ), φλαβονοειδή (όπως λουτεολίνη, απιγενίνη)⁷⁸. Στα τριτερπενοειδή περιλαμβάνονται το ουρσολικό οξύ και το ολεανολικό οξύ⁷⁸. Το αιθέριο έλαιο της *O. vulgare* ενεργοποίησε το μονοπάτι του Nrf2 σε κυτταρική σειρά δωδεκαδακτύλου χοίρου (Intestinal porcine enterocytes from Jejunum / IPEC – J2)⁷⁹.

1.7.14 Ροδιόλα



Εικόνα 20: Ροδιόλα σε μορφή σκόνης

Η *R. rosea* (Εικόνα 20) είναι ένα προσαρμογόνο¹ φυτό με αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντιβακτηριδιακή δράση⁶⁵. Τα φυτά του γένους *Rhodiola* είναι πλούσια σε φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, φλαβονολιγνάνες, ταννίνες, κυανογόνοι γλυκοζίτες και παράγωγα κινναμωμικού οξέος όπως ροζαρίνη, ραζαβίνη⁶⁵. Η *R. rosea* είναι η μοναδική που περιέχει ροζαβίνες⁶⁵. Οι ρίζες του φυτού αυτού χρησιμοποιούνται εδώ και χρόνια για την καταπολέμηση της κούρασης, του άγχους, της κατάθλιξης, τους στρες και καρδιαγγειακών νόσων⁶⁵. Παράλληλα χρησιμοποιείται για τη βελτίωση της απόδοσης τόσο σε επίπεδο σωματικό όσο και σε νοητικό επίπεδο⁶⁵. Η *R. rosea* συμμετέχει στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού και του ενδοκρινικού συστήματος⁶⁵. Η *R. rosea* προσφέρεται στο εμπόριο σε διάφορες μορφές (συμπλήρωμα διατροφής, πρόσθετο τροφίμου, ρόφημα κ.α.)⁶⁵. Διαφορετικά εκχυλίσματα του φυτού έχουν διαφορετική δραστηριότητα. Το αιθανολικό εκχύλισμα *R. rosea* έχει υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με το υδατικό, γεγονός το οποίο αποδόθηκε στην υψηλότερη συγκέντρωση φαινολικών ουσιών, κυρίως σαλιδρυσίδης⁶⁵. Η σαλιδρυσίδα επάγει την έκφραση του Nrf2 και αναστέλλει το μονοπάτι του NF-κB⁶⁶.

1.7.15 Σπαθόχορτο

Το *H. perforatum* (Εικόνα 21) γνωστό αλλιώς ως σπαθόχορτο, βαλσαμόχορτο, βότανο του Αγίου Ιωάννη, χρησιμοποιείται για αιώνες ως φαρμακευτικό βότανο⁶⁷. Η χρήση του μπορεί να είναι εξωτερική (για τη θεραπεία εγκαυμάτων, την αντιμετώπιση του πόνου και άλλα), ή εσωτερική⁶⁷. Το σπαθόχορτο έχει αντιμικροβιακές, αντιϊκές, αντικαρκινικές, αντικαταθλιπτικές, νευροπροστατευτικές, αντιφλεγμονώδεις και αναλγητικές



Εικόνα 21: Σπαθόχορτο

¹Προσαρμογόνο Βότανο: συμβάλει στη φυσιολογική αντιμετώπιση στρεσογόνων παραγόντων του οργανισμού. Οι στρεσογόνοι παράγοντες μπορεί να είναι φυσικοί, χημικοί, βιολογικοί⁶⁵

ιδιότητες⁶⁷. Η σύστασή του σε δευτερογενείς μεταβολίτες εξαρτάται, όπως σε όλα τα φυτά, από παράγοντες όπως χρόνος συγκομιδής, η επεξεργασία των δειγμάτων, ο ιστός που εκχυλίζεται όμως τα εκχυλίσματα του φυτού αποτελούνται κατά το ένα πέμπτο από βιοδραστικές ουσίες⁶⁷. Η χορήγησή του είναι σχετικά ασφαλής, πέρα από μερικές περιπτώσεις εμφάνισης ελαφριών παρενεργειών, όμως ρυθμίζει μεταβολικά ένζυμα και επάγει τη γλυκοπρωτεΐνη P (υπεύθυνη για την αποβολή φαρμάκων)⁶⁷. Επομένως, κατά τη χορήγησή του εμαφνίζονται αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα που μπορεί να χορηγούνται⁶⁷. Το βαλσαμόχορτο περιλαμβάνει μεταξύ άλλων και ρουτίνη, κουερσετίνη (ενισχύει τη δράση του Nrf2) και υπεροσίδη^{67,68}. Η υπεροσίδη είναι μια τροποποιημένη μορφή της κουερσετίνης και επάγει την μετατόπιση του Nrf2 στον πυρήνα⁶⁷.

1.7.16 Τσάι του βουνού

Το τσάι του βουνού ή σιδερίτης (Εικόνα 22) είναι τσάι που δημιουργείται με την εκχύλιση βοτάνου του γένους *Sideritis*. Χρησιμοποιούνται ως αντιμικροβιακά, αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτικά, αντιυπεργλυκαιμικά αλλά και για τη βελτίωση πνευματικών λειτουργιών και της μνήμης^{69,70}, με το *S. scardica* να σχετίζεται με όλες τις παραπάνω δράσεις, ενώ μελετάται και ως χημειοπροστατευτικό⁷¹. Το *S. scardica*, μαζί με άλλα είδη του γένους *Sideritis*, έχει αναγνωρισμένη, από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (European Medicines Agency – EMA), χρήση κατά του κρυολογήματος, του βήχα και γαστρεντερικών διαταραχών⁷². Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες μπορούν να αποδοθούν στο περιεχόμενό τους σε φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα και τερπενοειδή, ιδιαίτερα τα διτερπένια⁴⁷. Αρκετά διτερπένια όπως ανδαλουσόλη, χονχτριόλη, λαγκασκατριόλη, τα οποία είναι τα κύρια διτερπένια στα είδη *Sideritis*, δρουν ως επαγωγείς του Nrf2⁴⁸. Το *S. scardica* περιέχει και απιγενίνη, η οποία ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, με την αυξορρύθμιση του p53 και την ενεργοποίησή του, τον έλεγχο κυτταρικής αύξησης και απόπτωσης και αναστέλλει τον NF-κB⁷³. Η απιγενίνη μειορύθμισε τον Nrf2 και κάποια από τα γονίδια στόχους του σε κύτταρα ανθρώπινου ηπατοκυτταρικού καρκινώματος με αντίσταση σε δοξορουβικίνη (κύτταρα: BEL-7402/ADM)²⁰.



Εικόνα 22: Τσάι του βουνού

1.7.17 Φασκόμηλο



Εικόνα 23: Φασκόμηλο

Είδη φυτών του γένους *Salvia* χρησιμοποιούνται για το άρωμά τους ως καλλυντικά ή για τις φαρμακευτικές τους ιδιότητες στην ιατρική⁷⁴. Τα φύλλα τους χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία διαφόρων παθήσεων όπως γαστρεντερικών ή δερματικών⁷⁴. Έχει ιδιότητες όπως αντιμικροβιακή, αντιδιαβητική, νευροπροστατευτική, αντιφλεγμονώδη^{74,75}. Παρουσιάζει έντονη αντιοξειδωτική δράση⁷⁶. Στο *S. officinalis* (Εικόνα 23) περιέχονται πολυφαινόλες (ρουτίνη, ροσμαρινικό οξύ, κουερσετίνη και άλλες), φαινολικά οξέα (π.χ. καφεϊκό οξύ), τερπενοειδή (όπως καρβακρόλη)⁷⁴. Το *S. officinalis* περιέχει επίσης φαινολικά διτερπένια (όπως καρνοσόλη) τα οποία επάγουν την ενεργοποίηση του Nrf2⁷⁵.

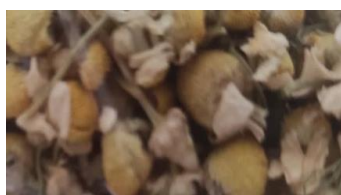
1.7.18 Φραγκοστάφυλλο

Το μαύρο φραγκοστάφυλλο (Εικόνα 24) καλλιεργείται για τη βρώση του φρούτου του⁷⁷. Τα φύλλα του χρησιμοποιούνται για την ίαση παθήσεων για πάνω από 1000 χρόνια⁷⁸. Το φυτό παραδοσιακά χρησιμοποιείται για τη θεραπεία παθήσεων των αρθρώσεων και του ουροποιητικού⁷⁹. Το *R. nigrum* έχει αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες και σε *in vivo* πειράματα έχει αποδειχθεί η δράση του προς τη θεραπεία πληγών⁷⁹. Σε *in vitro* μελέτη το εκχύλισμά του προσδιορίστηκε ως το δεύτερο πιο ισχυρό ως προς την ανίχνευση ελεύθερων ριζών, ανάμεσα σε άλλα 8 είδη μούρων⁷⁸. Είναι πλούσιο σε ανθοκυανίνες, προανθοκυανιδίνες, πολυφαινόλες και φλαβονοειδή (όπως κουερσετίνη)^{78,79}. Σε φυσιολογικούς ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες (Normal Human Dermal Fibroblasts – NHDF) προσδιορίστηκε η δράση εκχυλίσματος *R. nigrum* να επάγει τη λειτουργία του Nrf2⁷⁸.



Εικόνα 24: Μαύρο Φραγκοστάφυλλο

1.7.19 Χαμομήλι

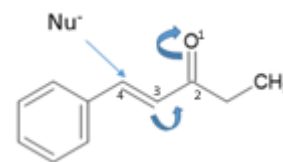


Εικόνα 25: Χαμομήλι

Το *M. chamomilla* (Εικόνα 25) είναι αρωματικό, γευστικό και χρωματιστό, με φαρμακευτικές ιδιότητες. Από τα αρχαία χρόνια χρησιμοποιούνταν για διαταραχές οίστρου και μετά τον τοκετό⁸⁰. Είναι αντιφλεγμονώδες με αντιοξειδωτικές, αντισηπτικές και αντισπασμωδικές ιδιότητες και χρησιμοποιείται ευρεία για την καταπολέμηση διαταραχών ύπνου, πέψης, άγχους, αλλά και την αντιμετώπιση του πόνου⁸⁰. Μελετάται για την αντιμετώπιση καρκίνου, διαβήτη και καρδιαγγειακών νόσων⁸⁰. Περιέχει φλαβονοειδή (όπως ρουτίνη, κουερσετίνη και σε υψηλά επίπεδα βρίσκονται η απιγενίνη και η λουτεολίνη)⁸⁰. Τα κύρια συστατικά του ελαίου από τα άνθη είναι τερπενοειδή και αζουλένια⁸⁰. Στο φυτό εντοπίζονται και φαινολικά οξέα (ένα παράδειγμα είναι το κουμαρικό)⁸⁰. Το χαμομήλι επάγει την ενεργοποίηση του Nrf2, ενώ συστατικά του ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση (λουτεολίνη) μέσω διαφόρων μονοπατιών όπως του p53 (απιγενίνη)⁸⁰.

1.8 1,4 Συζυγής προσθήκη

Στην 1,4 συζυγή προσθήκη (όπως στην Αντίδραση Michael) ένα πυρηνόφιλο προσβάλλει τη θέση 4 και έτσι η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε μορφή 1,4 (Εικόνα 26)⁸¹. Σε α,β ακόρεστες καρβονυλικές ενώσεις το πυρηνόφιλο προστίθεται στον β-άνθρακα⁸¹. Στις ενόνες δημιουργείται λόγω της δομής συντονισμού ηλεκτρονίων, όπου το οξυγόνο έλκει ηλεκτρόνια και έτσι ο β-άνθρακας αποκτά μερικώς θετικό φορτίο, ενώ το οξυγόνο αποκτά μερικώς αρνητικό φορτίο και ο διπλός δεσμός μετατοπίζεται⁸¹. Η αύξηση της ηλεκτροφιλικότητας

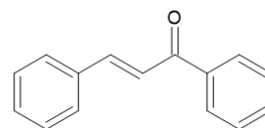


Εικόνα 26: Παράδειγμα 1,4 Συζυγούς προσθήκης, όπου Nu' ένα πυρηνόφιλο

ενός δέκτη Michael αυξάνει τις μη ειδικές αντιδράσεις, με αποτέλεσμα η ένωση να αντιδρά με διάφορα μόρια στο κύτταρο, όπως η Γλουταθειόνη και να αντιδρά ελάχιστα με τον κύριο στόχο⁸². Η μη ειδική αντίδραση αυξάνει την τοξικότητα της ένωσης⁸². Στα φυσικά προϊόντα οι δέκτες Michael βρίσκονται σε αναλογία 1:7, μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται η βιθαφερίνη Α, η κουρκουμίνη και οι χαλκόνες^{81,83}. Μια άλλη α,β ακόρεστη καρβονυλική ένωση είναι η ιονόνη και τα παράγωγά της, τα οποία βρίσκονται σε πληθώρα φυτικών προϊόντων⁸⁴.

1.8.1 Η Χαλκόνη και παράγωγά της

Οι χαλκόνες είναι φυσικές ακόρεστες πολυφαινόλες, πρόδρομες των κυκλικών φλαβονοειδών⁸⁵. Ο βασικός σκελετός των χαλκονών είναι η 1,3-διφαινυλπροπ-2-εν-1-όνη (Εικόνα 27)⁸⁵. Ο διπλός δεσμός ανάμεσα ανάμεσα στον α και β άνθρακα μπορεί να βρεθεί σε διαμόρφωση *trans* ή *cis*. Η *trans* είναι πιο σταθερή και είναι αυτή που συναντάται συνήθως στη φύση⁸⁵. Οι χαλκόνες είναι δραστικά, ηλεκτρόφιλα μόρια, τα οποία δρουν ως δέκτης αντίδρασης Michael και είναι αντιοξειδωτικά ενώ έχουν και ιδιότητες όπως αντιϊκή, κυτταροτοξική⁸⁵. Οι χαλκόνες αντιδρούν με τις θειολικές ομάδες κυστεϊνών, πολλές φορές μη ειδικά⁸⁵. Μπορούν να ρυθμίσουν τα μονοπάτια του Nrf2 και του NF-κΒ με τροποποίηση κυστεϊνών⁸⁵. Η ηλεκτροφιλικότητα του β-άνθρακα ορίζεται και από την ικανότητα αναγωγής της κετονομάδας, λόγω μετατόπισης ηλεκτρονίων⁸⁵. Δηλαδή στην ένωση η παρουσία του διπλού δεσμού με το οξυγόνο και η ικανότητά της αναγωγής του, επηρεάζει την δραστικότητα της ουσίας και την ικανότητά της να αντιδράσει με θειόλες. Έτσι βρέθηκε πως όσο πιο υψηλή είναι η ικανότητα αναγωγής τόσο πιο κυτταροτοξική είναι η ουσία⁸⁵.

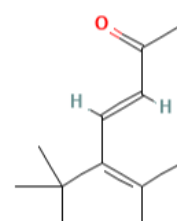


Εικόνα 27: Δομή της Χαλκόνης

Η βιολογική δραστικότητα ενός δέκτη αντίδρασης Michael είναι ανάλογη της ικανότητας αντίδρασης με θειόλες⁸⁵. Η αντιδραστικότητα με σουλφυδριλομάδες εξαρτάται από την ηλεκτροφιλικότητα της ένωσης⁸⁵. Η τροποποίηση με διαφόρους υποκαταστάτες ρυθμίζει τη βιοδραστικότητα της ένωσης⁸⁵. Οι υποκαταστάτες συνήθως προστίθενται ή σε έναν αρωματικό δακτύλιο ή στον α-άνθρακα⁸⁵. Η αύξηση της βιοδραστικότητας γίνεται με ηλεκτραρνητικές ομάδες, καθώς αυτές έλκουν τα ηλεκτρόνια, η αντίδραση Michael γίνεται ευκολότερη, αφού αυξάνεται η ηλεκτροφιλικότητα του δέκτη της αντίδρασης⁸⁵. Η δραστικότητα της ένωσης εξαρτάται και από τη διαμόρφωση της ένωσης⁸⁵.

1.8.2 Η Ιονόνη και τα παράγωγά της

Η ιονόνη πρόκειται για ένα μονοκυκλικό τερπενοειδές με 13 άτομα άνθρακα⁸⁴, (Εικόνα 28⁸⁶). Η ιονόνη μπορεί να συντεθεί και χημικά *in vitro*, αλλά και στη φύση, ιδιαίτερα από φρούτα και λαχανικά⁸⁴. Στα φυσικά προϊόντα εντοπίζεται συνήθως στα έλαιά τους⁸⁴. Δύο από τις φυσικές ιονόνες είναι η α- και η β-ιονόνη, οι οποίες έχουν στη δομή τους την 3βουτεν-2όνη συνδεδεμένη με ένα δακτύλιο 6 ανθράκων με ένα διπλό δεσμό, ο οποίος βρίσκεται σε διαφορετική θέση στην α- από τη β- ιονόνη⁸⁴. Η ιονόνη εκτός από το χαρακτηριστικό της άρωμα (της βιολέτας), το οποίο γίνεται αντιληπτό μέσω ειδικών οσφρητικών υποδοχέων, των 51E2 (Olfactory Receptor



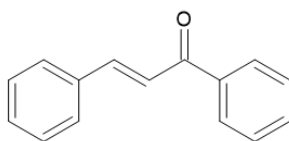
Εικόνα 28: β-Ιονόνη⁸⁶. National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 638014, beta-ionone" PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/beta-ionone>. Accessed 18 June, 2022.

51E2 – OR51E2), παίζει και άλλους ποικίλους ρόλους⁸⁴. Οι ρόλοι αυτοί (όπως η ρύθμιση της κυτταροκίνησης, του πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων, της έκκρισης σεροτονίνης) βασίζονται στην ύπαρξη των OR51E2 σε διάφορους ιστούς⁸⁴.

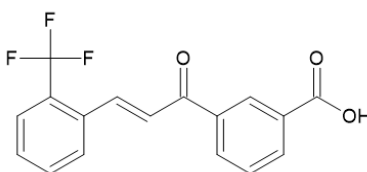
Η β-ιονόνη χαρακτηρίζεται από ιδιότητες όπως αντικαρκινική αλλά και ικανή να προωθήσει τον καρκίνο (ανάλογα με τα κύτταρα στα οποία δρα), αντιφλεγμονώδης και αντιμικροβιακή⁸⁴. Η δράση της όμως στηρίζεται στην ενεργοποίηση του υποδοχέα καθώς δρα ως αγωνιστής. Σε καρκινικά κολικά κύτταρα η β-ιονόνη προσδένεται στον υποδοχέα-α ρετινοειδών X (Retinoid X Receptor α – RXR- α), αυξάνοντας τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα⁸⁴. Ο RXR- α αναστέλλει την έκφραση τη δράση του Nrf2 με απευθείας πρόσδεσης στο κέντρο Neh7²⁰. Η α -ιονόνη αντίθετα μπορεί να δρα ως αγωνιστής ή ως ανταγωνιστής, η δράση της ως αντικαρκινικό επίσης ποικίλλει καθώς ανάλογα τη δόση μπορεί να ενεργοποιεί διαφορετικά μεταγωγικά μονοπάτια. Άλλα παράγωγά ιονόνης έχουν χαρακτηριστεί ως αντικαρκινικά⁸⁴.

1.8.3 Συνθετικές ενώσεις στην παρούσα εργασία

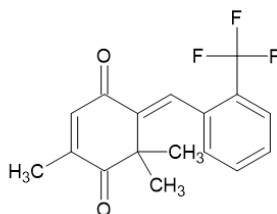
Οι συνθετικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία είναι κετόνες με ομάδες που μπορούν να δράσουν ως δέκτες Michael. Στη συνέχεια παρουσιάζονται η Χαλκόνη (Ένωση 1), τα παράγωγα Χαλκόνης, Ιονόνης που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και οι ενώσεις οι οποίες έδειξαν δραστηριότητα σε τουλάχιστον μία από τις μεθόδους που εξετάστηκαν (Οι ενώσεις αυτές είναι οι 1-16, 18, 19, 21-30, 32-41, 44, 47, 48, 53, 57, 58 και 69):



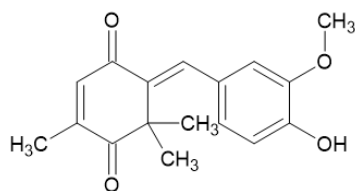
Εικόνα 29: Ένωση 1, Χαλκόνη



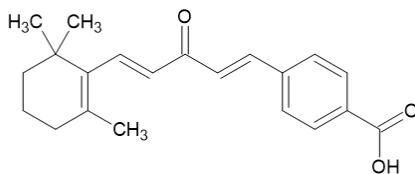
Εικόνα 30: Ένωση 2, 3-((2E)-3-[2-(trifluoromethyl)phenyl]prop-2-enoyl)benzoic acid



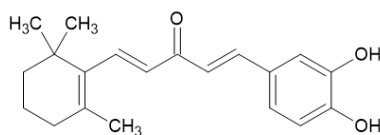
Εικόνα 31: Ένωση 3(5E)-2,6,6-trimethyl-5-[(2-(trifluoromethyl)phenyl)methylidene]cyclohex-2-ene-1,4-dione



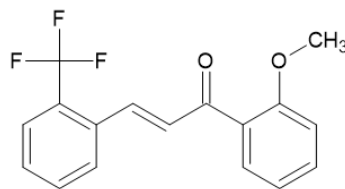
Εικόνα 32: Ένωση 4, (5E)-5-[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)methylidene]-2,6,6-trimethylcyclohex-2-ene-1,4-dione



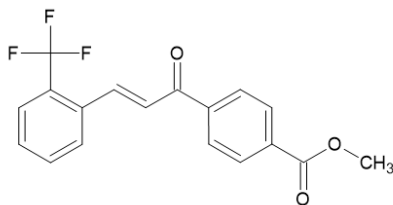
Εικόνα 33: Ένωση 5, 4-[(1E,4E)-3-oxo-5-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)penta-1,4-dien-1-yl]benzoic acid



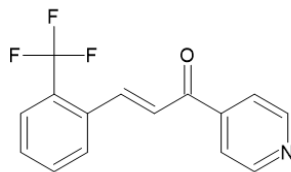
Εικόνα 34: Ένωση 6, (1E,4E)-1-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)penta-1,4-dien-3-one



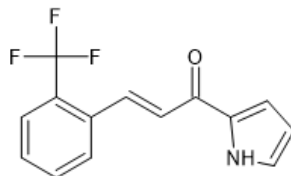
Εικόνα 35: Ένωση 7, (2E)-1-(2-methoxyphenyl)-3-[2-(trifluoromethyl)phenyl]prop-2-en-1-one—benzene (1/1)



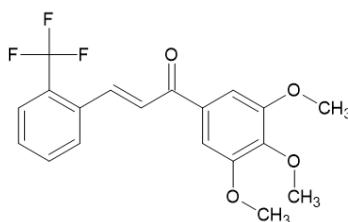
Εικόνα 36: Ένωση 8, methyl 3-[(2E)-3-[2-(trifluoromethyl)phenyl]prop-2-enoyl]benzoate



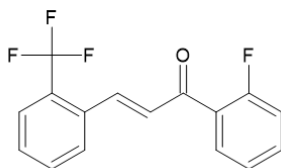
Εικόνα 37: Ένωση 9, (2E)-1-(pyridin-4-yl)-3-[2-(trifluoromethyl)phenyl]prop-2-en-1-one



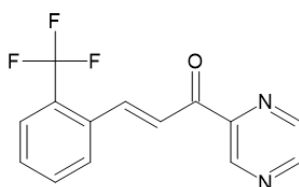
Εικόνα 38: Ένωση 10, (2E)-1-(1H-pyrrol-2-yl)-3-[2-(trifluoromethyl)phenyl]prop-2-en-1-one



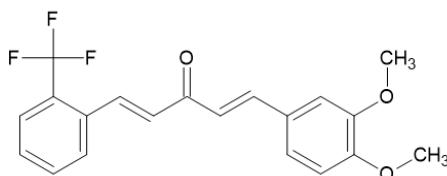
Εικόνα 39: Ένωση 11, (2E)-3-[2-(trifluoromethyl)phenyl]-1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one



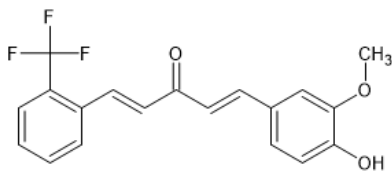
Εικόνα 40: Ένωση 12, (2E)-1-(2-fluorophenyl)-3-[2-(trifluoromethyl)phenyl]prop-2-en-1-one



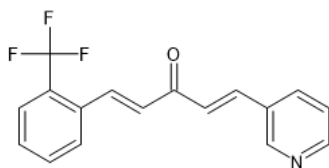
Εικόνα 41: Ένωση 13, (2E)-1-(pyrazin-2-yl)-3-[2-(trifluoromethyl)phenyl]prop-2-en-1-one



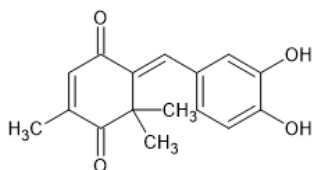
Εικόνα 42: Ένωση 14, (1E,4E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl)-5-[2-(trifluoromethyl)phenyl]penta-1,4-dien-3-one



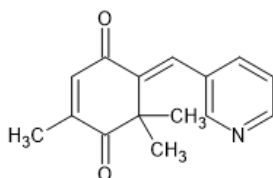
Εικόνα 43: Ένωση 15, (1E,4E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-[2-(trifluoromethyl)phenyl]penta-1,4-dien-3-one



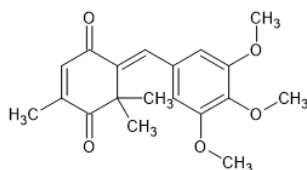
Εικόνα 44: Ένωση 16(1E,4E)-1-(pyridin-3-yl)-5-[2-(trifluoromethyl)phenyl]penta-1,4-dien-3-one



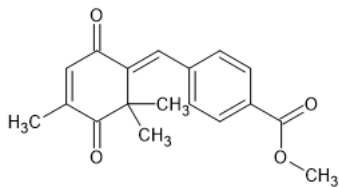
Εικόνα 45: Ένωση 18, (5E)-5-[(3,4-dihydroxyphenyl)methylidene]-2,6,6-trimethylcyclohex-2-ene-1,4-dione



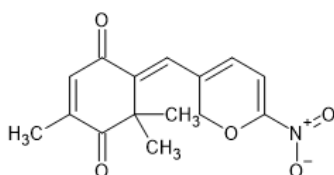
Εικόνα 46: Ένωση 19, (5E)-2,6,6-trimethyl-5-[(pyridin-3-yl)methylidene]cyclohex-2-ene-1,4-dione



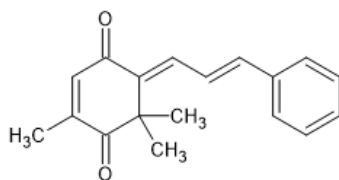
Εικόνα 47: Ένωση 20, (5E)-2,6,6-trimethyl-5-[(3,4,5-trimethoxyphenyl)methylidene]cyclohex-2-ene-1,4-dione



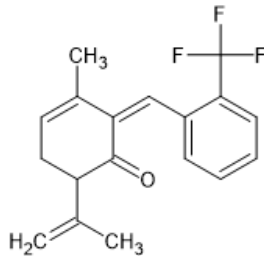
Εικόνα 48: Ένωση 21, methyl 4-[(E)-(4,6,6-trimethyl-2,5-dioxocyclohex-3-en-1-ylidene)methyl]benzoate



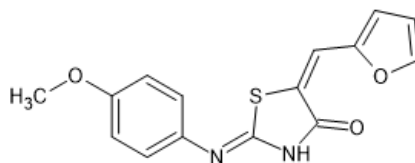
Εικόνα 49: Ένωση 22, (5E)-2,6,6-trimethyl-5-[(6-nitro-2H-pyran-3-yl)methylidene]cyclohex-2-ene-1,4-dione



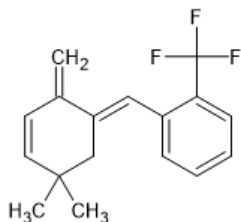
Εικόνα 50: Ένωση 23, (5E)-2,6,6-trimethyl-5-[(2E)-3-phenylprop-2-en-1-ylidene]cyclohex-2-ene-1,4-dione



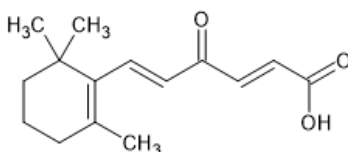
Εικόνα 51: Ένωση 24, (2Z)-3-methyl-6-(prop-1-en-2-yl)-2-[[2-(trifluoromethyl)phenyl]methylidene]cyclohex-3-en-1-one



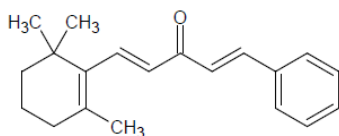
Εικόνα 52: Ένωση 25, (2Z,5E)-5-[(furan-2-yl)methylidene]-2-[(4-methoxyphenyl)imino]-1,3-thiazolidin-4-one



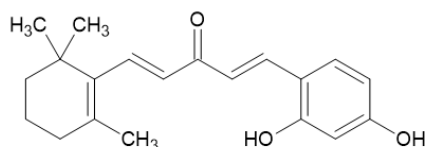
Εικόνα 53: Ένωση 26, 1-[(E)-(5,5-dimethyl-2-methylidenecyclohex-3-en-1-ylidene)methyl]-2-(trifluoromethyl)benzene



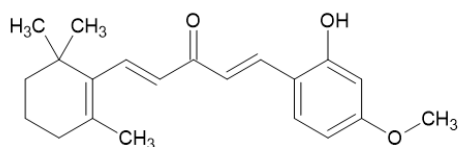
Εικόνα 54: Ένωση 27, (2E,5E)-4-oxo-6-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)hexa-2,5-dienoic acid



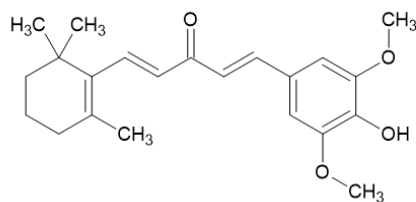
Εικόνα 55: Ένωση 28, (1E,4E)-1-phenyl-5-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)penta-1,4-dien-3-one



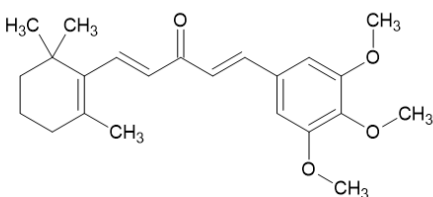
Εικόνα 56: Ένωση 29, (1E,4E)-1-(2,4-dihydroxyphenyl)-5-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)penta-1,4-dien-3-one



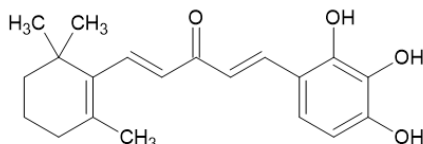
Εικόνα 57: Ένωση 30, (1E,4E)-1-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-5-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)penta-1,4-dien-3-one



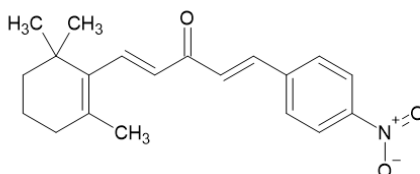
Εικόνα 58: Ένωση 32, (1E,4E)-1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-5-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)penta-1,4-dien-3-one



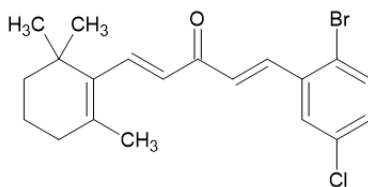
Εικόνα 59: Ένωση 33, (1E,4E)-1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-5-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)penta-1,4-dien-3-one



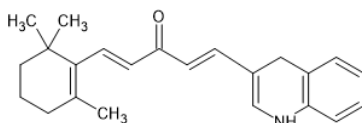
Εικόνα 60: Ένωση 34, (1E,4E)-1-(2,3,4-trihydroxyphenyl)-5-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)penta-1,4-dien-3-one



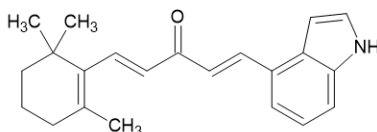
Εικόνα 61: Ένωση 35, (1E,4E)-1-(4-nitrophenyl)-5-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)penta-1,4-dien-3-one



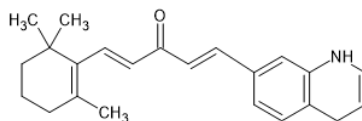
Εικόνα 62: Ένωση 36, (1E,4E)-1-(2-bromo-5-chlorophenyl)-5-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)penta-1,4-dien-3-one



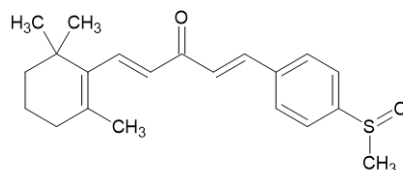
Εικόνα 63: Ένωση 37, (1E,4E)-1-(1,4-dihydroquinoline)-5-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)penta-1,4-dien-3-one



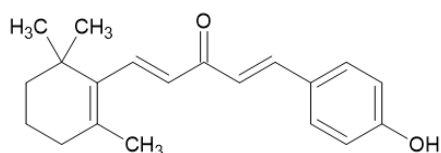
Εικόνα 64: Ένωση 38, (1E,4E)-1-(1H-indol-4-yl)-5-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)penta-1,4-dien-3-one



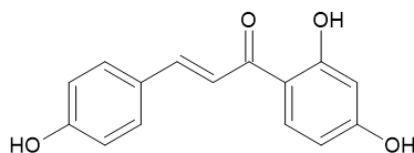
Εικόνα 65: Ένωση 39, (1E,4E)-1-(1H-indol-6-yl)-5-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)penta-1,4-dien-3-one



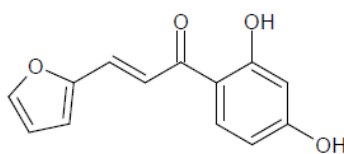
Εικόνα 66: Ένωση 40, (1E,4E)-1-(4-Methanesulfonyl-phenyl)-5-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)penta-1,4-dien-3-one



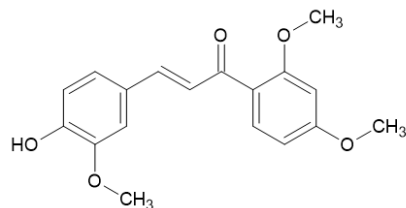
Εικόνα 67: Ένωση 41, (1E,4E)-1-(4-hydroxyphenyl)-5-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)penta-1,4-dien-3-one



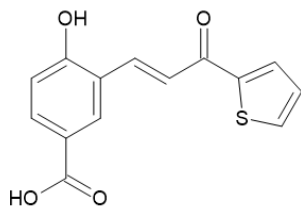
Εικόνα 68: Ένωση 42, (2E)-1-(2,4-dihydroxyphenyl)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one



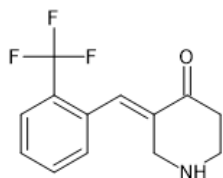
Εικόνα 69: Ένωση 43, (2E)-1-(2,4-dihydroxyphenyl)-3-(furan-2-yl)prop-2-en-1-one



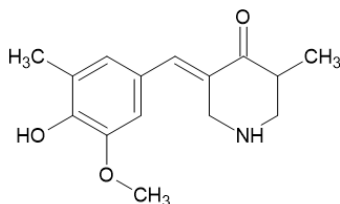
Εικόνα 70: Ένωση 44, (2E)-1-(2,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one



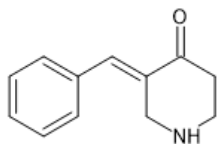
Εικόνα 71: Ένωση 45, 4-hydroxy-3-[(1E)-3-oxo-3-(thiophen-2-yl)prop-1-en-1-yl]benzoic acid



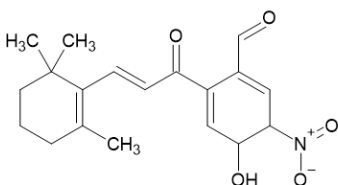
Εικόνα 72: Ένωση 47, (3E)-3-[[2-(trifluoromethyl)phenyl]methylidene]piperidin-4-one



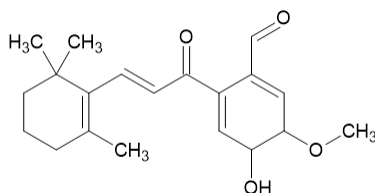
Εικόνα 73: Ένωση 48, (3E)-3-[[4-hydroxy-3-methoxy-5-methylphenyl]methylidene]-5-methylpiperidin-4-one



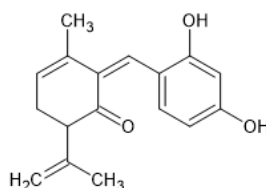
Εικόνα 74: Ένωση 53, (3E)-3-benzylidenepiperidin-4-one



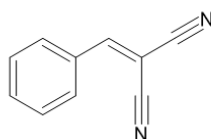
Εικόνα 75: Ένωση 56, 4-hydroxy-5-nitro-2-[3-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)prop-2-enoyl]benzaldehyde



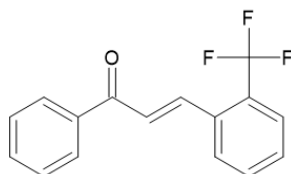
Εικόνα 76: Ένωση 57, 4-hydroxy-5-methoxy-2-[3-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)prop-2-enyl]benzaldehyde



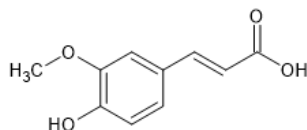
Εικόνα 77: Ένωση 58, (2Z)-2-[(2,4-dihydroxyphenyl)methylidene]-3-methyl-6-(prop-1-en-2-yl)cyclohex-3-en-1-one



Εικόνα 78: Ένωση 61, benzylideneprapanedinitrile



Εικόνα 79: Εικόνα 64, (2E)-1-phenyl-3-[2-(trifluoromethyl)phenyl]prop-2-en-1-one



Εικόνα 80: Ένωση 69, (2E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-enoic acid

1.9 Στην παρούσα μελέτη

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση *in vitro* φυσικών και συνθετικών προϊόντων, με τη δοκιμασία DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) και τη δοκιμασία ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)). Η δοκιμασία αντίδρασης με σουλφυδριλομάδες πραγματοποιήθηκε με μερικές από τις συνθετικές ενώσεις. Βάσει των αποτελεσμάτων συγκεκριμένα συνθετικά προϊόντα και φυσικά προϊόντα επιλέχθηκαν για τη δοκιμασία επαγωγής του Nrf2 σε κύτταρα ερυθρολευχαιμίας (κυτταρική σειρά K562). Τα κύτταρα

K562 είναι κύτταρα χρόνιας μυελοειδούς λευχαιμίας, η οποία είναι ένας τύπος αιματολογικού καρκίνου που εντοπίζεται νεαρές ηλικίες και περισσότερο σε ασιατικές χώρες⁸⁷. Παρά τις υπάρχουσες μεθόδους αντιμετώπισης, ακόμα υπάρχουν θάνατοι από την ασθένεια αυτή⁸⁷. Τα κύτταρα της σειράς K562 απομονώθηκαν το 1975 από ασθενή⁸⁷.

2. Μέθοδοι και υλικά

2.1 Χημικά, Αντιδραστήρια και Υλικά

Για τη σχεδίαση των χημικών δομών χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό ACD/ChemSketch Freeware For Windows, 2021, version 2021.2.1, Toronto, Ontario, Canada, Advanced Chemistry Development Inc.⁸⁸). Τα κύτταρα K562 και οι εκκινητές (primers) για τα γονίδια *GCLC* και *HO-1*, ήταν ευγενική χορηγία του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας του τμήματος Φαρμακευτικής, σχολής Επιστημών Υγείας, του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Οι συνθετικές ενώσεις, των οποίων η δράση δοκιμάστηκε, αποτελούν ευγενική χορηγία του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας και Τοξικολογίας του τμήματος Κτηνιατρικής, σχολής Επιστημών Υγείας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η αλβουμίνη ορού Βοδινού και το HEPES ήταν ευγενική χορηγία του Εργαστηρίου Βιοχημείας του Τμήματος Κτηνιατρικής, σχολής Επιστημών Υγείας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αντιδραστήριο	Εταιρία
ABTS	Fluorochem Ltd, Glossop, UK
Ammonium Thiocyanate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA (Fisher Scientific)
Apopain	AnaSpec, Fremont, Ca, USA
Sodium L-Ascorbate	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Caffeic Acid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Chloroform	VWR International, LLC., Radnor, Pennsylvania, USA
Coomassie Blue G250	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA (Thermo Scientific)
Cysteamine	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA (Fisher Scientific)
Cysteine	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA (Fisher Scientific)
Dimethyl Fumarate	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Disodium Phosphate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA (Fisher Scientific)
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

DPPH	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DMSO	PanReac AppliChem, Barcelona, Spain
EDTA	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA (Fisher Scientific)
Ethylene Glycol	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA (Fisher Scientific)
Eugenol	Fluorochem Ltd, Glossop, UK
EtOH	Thermo Fisher Scientific
FBS	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Folin-Ciocalteu	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Gallic Acid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Glycerol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Guanidinium Thiocyanate	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isopropanol	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA (Fisher Scientific)
MeOH	VWR International, LLC., Radnor, Pennsylvania, USA
NAC	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA (Fisher Scientific)
Nonidet P40	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA (Fisher Scientific)
One-Step RT PCR kit	Meridian Bioscience Inc., Cincinnati, Ohio, USA
Penicillin-Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA (Gibco)
Phenol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Phosphoric Acid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Potassium Chloride	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA (Fisher Scientific)
Potassium Persulfate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA (Fisher Scientific)
Potassium Phosphate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA (Fisher Scientific)
RPMI-1640	Biosera, France
Sodium Acetate	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Sodium Carbonate	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Sodium Chloride	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
TBHQ	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA (Fisher Scientific)
Thioglycolic acid	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA (Fisher Scientific)
Tris HCl	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA (Fisher Scientific)
Trolox	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Μηχανήματα	Εταιρία
Αναλυτής πλακών ELISA (Plate Reader infinite 200Pro)	Tecan Trading AG, Switzerland
Ανάστροφο Μικροσκόπιο (Inverted microscope Wilovert Standard PH40, bino, 100x - 400x)	Helmut Hund GmbH, Germany
Περιστροφικός Εξατμιστής (Hei-Vap Core)	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Germany
Φασματοφωτόμετρο (U-1900 Spectrophotometer)	Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan
Φυγόκεντρος	Centurion Corporation Limited, Singapore
Υδατόλουτρο (Thermo Haake heating circulator of the C/DC class)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Real Time PCR (Light Cycler 2.0* System)	Roche Molecular Systems, Inc., Pleasanton, CA, USA

2.2 Εκχύλιση φυτών

Από κάθε φυτό 5g εκχυλίστηκαν σε 50ml διαλύτη, σε θερμοκρασία δωματίου. Το κάθε φυτό εκχυλίστηκε με διαφορετικό διαλύτη (ο οποίος ήταν ή υδατικό διάλυμα (ΥΔ) οργανικού διαλύτη, ή μεθανόλη) και για διαφορετικό χρόνο. Οι συνθήκες εκχύλισης για το κάθε φυτό περιγράφονται στον πίνακα 2.

Έπειτα πραγματοποιήθηκε διήθηση των εκχυλισμάτων προκειμένου να απομακρυνθούν τα στερεά μέρη του φυτού. Η διήθηση πραγματοποιήθηκε με διηθητικά χαρτιά (Whatman quantitative Filter

Paper, Ashless, Grade42). Από κάθε φυτό απομονώθηκε ένας συγκεκριμένος όγκος υγρής φάσης και ακολούθησε εξάτμιση/συμπύκνωση των δειγμάτων σε περιστροφικό εξατμιστή σε θερμοκρασία 50°C και υπό κενό. Τα τελικά προϊόντα επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε EtOH. Οι όγκοι μετά τη διήθηση και μετά την επαναδιαλυτοποίηση, καθώς και η περιεκτικότητα κάθε μείγματος σε φυτό αναγράφονται στον πίνακα 2.

Φυτό	Χρόνος εκχύλισης	Διαλύτης	Αρχική Ποσότητα (g)	Αρχικός όγκος	Όγκος μετά διήθησης	τελικός όγκος (ml)	Περιεκτικότητα φυσικού προϊόντος στο διάλυμα (g/ml)
Βιθανία	1d	ΥΔ 10% EtOH	5	50ml	36ml	9	0.56
Βοσβέλια	4h	MeOH	5	50ml	37ml	12.5	0.4
Γαϊδουράγκαθο (Φύλλο)	4d	ΥΔ 80% EtOH	5	50ml	33,5ml	6.5	0.776
Γαϊδουράγκαθο (Σπόρος)	4d	ΥΔ 80% EtOH	5	50ml	37ml	8	0.625
Δεντρολίβανο	1d	ΥΔ 80% EtOH	5	50ml	31ml	20	0.25
Ελιά	4h	ΥΔ 80% EtOH	5	50ml	34ml	15	0.33
Ευφρασία	1d	ΥΔ 70% MeOH	5	50ml	29ml	12	0.42
Θυμάρι	1d	ΥΔ 70% EtOH	5	50ml	32ml	11	0.45

Καλέντουλα	1h	ΥΔ 80% EtOH	5	50ml	34ml	10.5	0.476
Κυνόροδο	1h	ΥΔ 70% EtOH	5	50ml	37,5ml	9	0.56
Λευκό Μούρο	2d	ΥΔ 95% EtOH	5	50ml	41	12	0.42
Μορίνγκα	1d	MeOH	5	50ml	38ml	5	1
Πρόπολη	2d	ΥΔ 70% EtOH	5	50ml	35ml	13	0.38
Ρίγανη	4w	ΥΔ 40% EtOH	5	50ml	25ml	15	0.33
Ροδιόλα	4d	ΥΔ 70% EtOH	5	50ml	33,5ml	9	0.56
Σπαθόχορτο	5d	ΥΔ 70% EtOH	5	50ml	31,5ml	9.5	0.53
Τσάι του Βουνού	1d	MeOH	5	50ml	29ml	5	1
Φασκόμηλο φύλλα	1d	ΥΔ 70% MeOH	5	50ml	34,5ml	20	0.25
Φραγκοστάφυλλο	1d	ΥΔ 50% EtOH	5	50ml	34,5ml	15.5	0.32

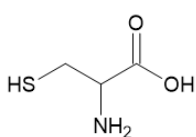
Χαμομήλι	5d	ΥΔ 50% EtOH	5	50ml	29,5ml	9.5	0.53
----------	----	-------------------	---	------	--------	-----	------

Πίνακας 2: Συνθήκες και διαλύτης εκχύλισης φυσικών προϊόντων: παρουσιάζεται ο χρόνος εκχύλισης, ο διαλύτης εκχύλισης, η μάζα του φυσικού προϊόντος που χρησιμοποιήθηκε, ο αρχικός όγκος, ο όγκος που συλλέχθηκε μετά τη διήθηση του μείγματος, ο τελικός όγκος επαναδιάλυσης, και η περιεκτικότητα του φυσικού προϊόντος στο τελικό διάλυμα (g/ml).

2.3 Συνολικό Φαινολικό Περιεχόμενο

Το συνολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων φυσικών προϊόντων, σε φαινόλες προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίων από τις φαινολικές ουσίες σε σύμπλοκα φωσφομολυβδαινικού/φωσφοβολφραμικού οξέος, σε αλκαλικό περιβάλλον. Η αναγωγή των συμπλόκων με ένα ή δύο ηλεκτρόνια οδηγεί στο σχηματισμό χρωμοφόρας ένωσης, η οποία δίνει στο διάλυμα ένα μπλε χρώμα. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι όπως περιγράφεται από τους Ainsworth και Gillespie⁸⁹. Συγκεκριμένα, προετοιμάστηκαν τα εξής: ένα υδατικό διάλυμα 700mM Na₂CO₃, διαλύματα με 95% MeOH, με διαφορετικές συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος (0.77-9.67μM) που χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας. Από κάθε δείγμα 100μL προστέθηκαν σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα, έπειτα προστέθηκαν 200μL διαλύματος 10% Folin-Ciocalteu και ακολούθησε ανάδευση σε vortex για τη πλήρη ανάμειξη των διαλυμάτων. Μετά το πέρας 2min προστέθηκαν 700μL διαλύματος Na₂CO₃. Τα δείγματα επώαστηκαν για 2h σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα φωτομετρήθηκαν σε μήκος κύματος 765nm. Στο θετικό μάρτυρα χρησιμοποιήθηκε το γαλλικό οξύ αντί του δείγματος, από το οποίο παράχθηκε και η πρότυπη καμπύλη. Από την πρότυπη καμπύλη υπολογίστηκε το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο του εκάστοτε εκχυλίσματος, εκφράζοντάς το ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος (mg Gallic acid equivalent (GAE)/g προϊόντος). Στον αρνητικό μάρτυρα αντί για 100μL δείγματος προστέθηκαν 100μL διαλύτη. Η δοκιμάσια πραγματοποιήθηκε για κάθε δείγμα εις τριπλούν.

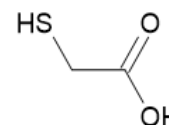
2.4 Αντίδραση με Θειόλες



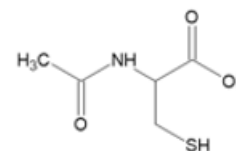
Εικόνα 82: Κυστεΐνη

Προκειμένου να εντοπιστούν οι ενώσεις που είναι πιο δραστικές ως δέκτες αντιδράσεων Michael κατά την αντίδραση με θειόλη, ακολουθήθηκε η μέθοδος, η οποία αναφέρεται από τους Amslinger και συν.⁸². Η μέθοδος αυτή στηρίζεται την ικανότητα των δεκτών κατά

Michael να αντιδρούν με σουφλυδριλικές ομάδες θειολών. Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε ήταν το εξής: Προετοιμάστηκε Ρυθμιστικό διάλυμα 1 (Buffer 1) που περιείχε 100mM Tris-HCl, 2mM EDTA σε pH 7,4. Το Ρυθμιστικό αναμείχθηκε με αιθυλενογλυκόλη σε αναλογία 2:8. Σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκε 1mL από το διάλυμα αυτό, ποσότητα της συνθετικής ένωσης και κυστεαμίνη σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από 60 φορές υψηλότερη από τη συγκέντρωση της ένωσης, ώστε να επικρατεί αντίδραση ψευδούς πρώτης



Εικόνα 83: Θειογλυκολικό οξύ

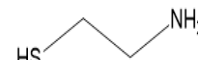


Εικόνα 81: N-ακετυλοκυστεΐνη

τάξης. Η φωτομέτρηση έγινε στο μήκος κύματος που απορροφά μέγιστα η κάθε ουσία, το οποίο προσδιορίστηκε με σάρωση μήκος κύματος από το φασματοφωτόμετρο. Η απορρόφηση μετρήθηκε στους χρόνους 0min, 1min, 11min, 21min, 31min, 41min. Έξι από τις πιο δραστικές ουσίες δοκιμάστηκαν για αντίδραση με Θειογλυκολικό οξύ, L-κυστεΐνη και N-ακέτυλο-κυστεΐνη, τηρώντας ίδιους χρόνους μέτρησης. Η σταθερά αντίδρασης της ψευδο-πρώτης τάξης αντίδρασης, k_1 , υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση⁸²

$$k_1 = -\frac{\ln \frac{A_0 - C}{A_0}}{t}$$

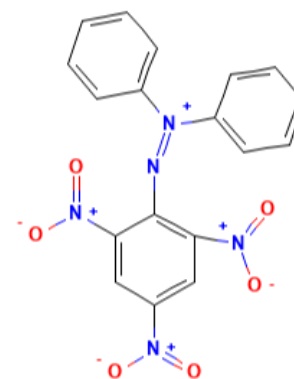
Η σταθερά k_2 , η οποία είναι η κινητική σταθερά της πραγματικής αντίδρασης δεύτερης τάξης υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο $k_2 = \frac{k_1}{[\text{θειόλη}]}$, όπως περιγράφεται από τους Amslinger και συν.⁸².



Εικόνα 84: Κυστεαμίνη

2.5 Δοκιμή Εξουδετέρωσης ρίζας DPPH

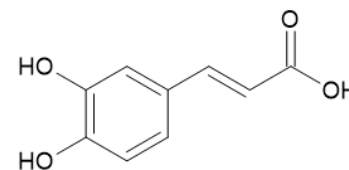
Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην απορρόφηση του διαλύματος DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl – DPPH – 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζύλη⁹⁰) σε μήκος κύματος 517nm. Η ρίζα DPPH• είναι σχετικά σταθερή και το διάλυμά της έχει ένα βαθύ μωβ χρώμα⁹¹. Μία ένωση που ανιχνεύει και εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες, ή είναι δότης υδρογόνου, μπορεί να ανάξει τη ρίζα στο πιο σταθερό μόριο DPPH, το οποίο δεν απορροφά στα 517nm και το μωβ χρώμα χάνεται⁹¹. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι όπως περιγράφεται από τους Murti και συν.⁹² με μερικές τροποποιήσεις. Συνοπτικά, ετοιμάστηκε μεθανολικό διάλυμα DPPH 1,3mg/ml. Από το διάλυμα αυτό προστέθηκαν 25μL σε δοκιμαστικό σωλήνα με 750μL MeOH και 25μL δείγματος ή διαλύτη του δείγματος (σε περίπτωση αρνητικού μάρτυρα). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το καφεϊκό οξύ⁹³. Τα διαλύματα αντίδρασης επώαστηκαν στο σκοτάδι για 30min και έπειτα πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απορρόφησης στα 517nm. Η δυνατότητα εξουδετέρωσης της DPPH• υπολογίζεται από τον τύπο:



Εικόνα 85: Δομή DPPH⁹⁰, National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 15911, DPPH radical" PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/DPPH-radical>. Accessed 15 June, 2022.

$$\%Scavenging(SCV) = \frac{(\text{Απορρόφηση control} - \text{Απορρόφηση sample})100}{\text{Απορρόφηση Control}}$$

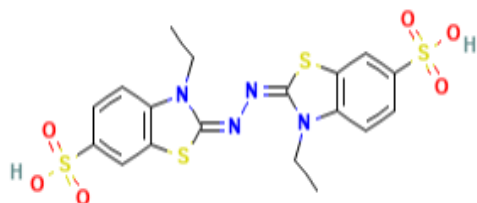
Όπου ως control αναφέρονται τα διαλύματα αρνητικού μάρτυρα και ως Sample τα διαλύματα με το προς εξέταση δείγμα ή το θετικό μάρτυρα. Με τη βοήθεια γραφήματος γραμμικής παλινδρόμησης προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του δείγματος η οποία οδηγεί σε SCV=50% (IC_{50}).



Εικόνα 86: Καφεϊκό οξύ

2.6 Δοκιμή Εξουδετέρωσης ρίζας ABTS

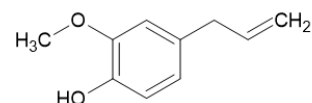
Η δοκιμασία αυτή στηρίζεται στην μέτρηση της εξουδετέρωσης της ρίζας $ABTS^{\bullet+}$ (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) – ABTS - 2,2' Αζινο-δι(3-αιθυλβενζοθιαζολιν-6-σουλφονικό οξύ)⁹⁴) από αντιοξειδωτικές ενώσεις⁹⁵. Υπάρχουν διάφορες παραλλαγές της μεθόδου.



Εικόνα 87: Δομή $ABTS^{94}$ National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 35687, Abts" PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Abts>. Accessed 15 June, 2022.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ABTS/PP, στην οποία η παραγωγή της ρίζας λαμβάνει χώρα κατά την αντίδραση του ABTS με το υπερθειικό κάλιο ($K_2S_2O_8$ - ((Potassium Persulfate – PP))⁹⁵. Ο μηχανισμός της αντίδρασης λαμβάνει χώρα σε 2 βήματα προς το σχηματισμό $ABTS^{\bullet+}$ και θειικών ανιόντων⁹⁵.

Η στοιχειομετρία της αντίδρασης είναι $2PP/1ABTS^{95}$. Η μέθοδος



Εικόνα 88: Δομή της Ευγενόλης

που ακολουθήθηκε είναι αυτή που περιγράφεται από τους Nenadis και συν.⁹⁶. Για το σχηματισμό του $ABTS^{\bullet+}$ προετοιμάστηκαν τα υδατικά διαλύματα 7mM ABTS και 140mM PP. Έγινε ανάμειξη 5mL από το ABTS διάλυμα με 88μL από το διάλυμα PP (τελική συγκέντρωση PP: 2.45mM). Το ανεμειγμένο διάλυμα φυλάχθηκε στο σκοτάδι για 16h. Έπειτα, το διάλυμα με το $ABTS^{\bullet+}$ αραιώθηκε με αιθανόλη μέχρι η απορρόφηση του διαλύματος σε μήκος κύματος (wavelength – λ) 734nm να είναι 0.700 ± 0.05 . Για το σχηματισμό της πρότυπης καμπύλης, χρησιμοποιήθηκε το Trolox, για το οποίο μετρήθηκε η μείωση της απορρόφησης στους χρόνους 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 min. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο διαλύτης της ουσίας, ή του εκχυλίσματος. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η ευγενόλη⁹⁷. Η μείωση της απορρόφησης του διαλύματος μετά τη χορήγηση του εκάστοτε δείγματος, μετρήθηκε στους χρόνους 0 min και 6min. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τριπλά δείγματα.

Το ποσοστό εξουδετέρωσης της ρίζας $ABTS^{\bullet+}$ υπολογίστηκε ομοίως με το ποσοστό εξουδετέρωσης DPPH. Συγκεκριμένα ισχύει ο τύπος $\%Scavenging(SCV) = \frac{(Απορρόφηση\ control - Απορρόφηση\ sample)}{Απορρόφηση\ Control} \times 100$ ⁹⁸. Έτσι προσδιορίστηκε η IC_{50} και σε αυτήν την περίπτωση.

2.7 Κυτταροκαλλιέργεια

Τα K562 καλλιεργήθηκαν σε κατάλληλες συνθήκες όπως έχουν περιγραφεί στις μελέτες^{23,87,99}. Συγκεκριμένα η καλλιέργεια έγινε σε θερπτικό μέσο RPMI1640, με 10% ορό νεογνού βοδινού (Fetal Bovine Serum – FBS), 100μg/ml στρεπτομυκίνη και 50μg/ml πενικιλίνη²³. Τα κύτταρα επώαζονταν στους 37°C, σε θάλαμο με υγρασία και 5% CO_2 . Η ανακαλλιέργεια γινόταν ανά 2-3 ημέρες, με τακτικό έλεγχο για επιμολύνσεις.

2.8 Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας

Για τη δοκιμασία κυτταροτοξικότητας κάθε ένωσης ή δείγματος τοποθετήθηκε ποσότητα κυτταροκαλλιέργειας πυκνότητας 10^5 κυττάρων ανά ml σε κάθε πηγαδάκι πλάκας 96-well. Στα πηγαδάκια αυτά τοποθετήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις από κάθε δείγμα (τελικός όγκος 200μl). Από τις συνθετικές ενώσεις χρησιμοποιήθηκε τελική συγκέντρωση 0.05mM. Από το κάθε εκχύλισμα φυσικού προϊόντος χρησιμοποιήθηκαν 3 συγκεντρώσεις (0.5μl, 1μl, 2μl). Στους μάρτυρες δεν προστέθηκε ένωση. Τα δείγματα ελέγχθηκαν στο μικροσκόπιο στις 24h και 48h και σημειώθηκε η κυτταροτοξικότητα που προκλήθηκε από το κάθε προϊόν, με βαθμονόμηση 1 έως 4 βαθμούς. Η βαθμολόγηση έγινε με βάση την κατάσταση θανάτωσης κυττάρων (απόπτωση, νεκρωση). Σε κύτταρα που έδειξαν διαφοροποίηση του σχήματός τους προστέθηκε το γράμμα (δ). Η διάκριση κυττάρων που βρίσκονται σε κατάσταση θανάτου (απόπτωσης, όγκωσης και νέκρωσης) έγινε με βάση τα χαρακτηριστικά που αναφέρονται από τους Balvan και συν.¹⁰⁰. Η μέθοδος για κάθε συγκέντρωση προϊόντος/ένωσης πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν.

2.9 Δοκιμασία κυτταρικής αύξησης

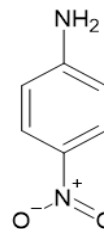
Σε πλάκες 24-well τοποθετήθηκαν από 2ml κυτταροκαλλιέργειας πυκνότητας 10^5 κύτταρα ανά ml. Στις καλλιέργειες προστέθηκε ποσότητα συνθετικής ένωσης ή εκχυλίσματος και αφέθηκε για 48h. Τα δείγματα που δοκιμάστηκαν ήταν αυτά που χρησιμοποιήθηκαν και για τη δοκιμασία της κασπάσης (2.11). Στους μάρτυρες δεν προστέθηκε τίποτα. Μετά το πέρας των 48h έγινε μέτρηση του αριθμού των κυττάρων. Ο προσδιορισμός της αύξησης των κυττάρων έγινε σύμφωνα με τις εργασίες^{23,101}. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer) και μετρήθηκε ο αριθμός κυττάρων ανά ml για κάθε περίπτωση, ώστε να γίνει σύγκριση με το μάρτυρα. Η διαδικασία για κάθε ένωση ή δείγμα που δοκιμάστηκε, επαναλήφθηκε 3 φορές.

2.10 Προσδιορισμός πρωτεϊνικού περιεχομένου

Ο προσδιορισμός του πρωτεϊνικού περιεχομένου των κυττάρων έγινε με τη μέθοδο Bradford¹⁰². Η μέθοδος Bradford στηρίζεται στην ικανότητα της χρωστικής Coomassie Blue G250 να προσδένεται στις πρωτεΐνες και κυρίως στα κατάλοιπα αργινίνης και λυσίνης¹⁰³. Κατά την πρόσδεσή της αλλάζει το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης της χρωστικής από 465nm στα 595nm¹⁰³. Έτσι, χρησιμοποιώντας μία πρωτεΐνη ως πρότυπη είναι δυνατό να υπολογιστεί η συγκέντρωση πρωτεϊνών σε ένα δείγμα¹⁰³. Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στο εγχειρίδιο της PanReac Applichem¹⁰³. Συγκεκριμένα, για την δημιουργία της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συγκεντρώσεις αλβουμίνης (0.9, 1.8, 2.7, 4.5, 6.8, 9, 18 μg/ml). Σε κάθε βοθρίο της πλάκας προστέθηκε ποσότητα δείγματος (2 ή 4μl) και έπειτα συμπληρώθηκε dH₂O μέχρι την ποσότητα των 20μl. Έπειτα προστέθηκαν 200μl από το αντιδραστήριο Bradford. Τα δείγματα μετρήθηκαν απευθείας σε Plate Reader infinite 200Pro (Tecan) στα 595nm. Η δοκιμή πραγματοποιήθηκε 3 φορές.

2.11 Προσδιορισμός ενεργότητας κασπάσης-3

Για τον προσδιορισμό της έκφρασης της κασπάσης ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο όπως περιγράφεται στις οδηγίες του κατασκευαστή της αποπαΐνης (υπόστρωμα κασπάσης)¹⁰⁴, έγινε τοποθέτηση των κυττάρων σε πλάκες 24-well. Σε κάθε πηγαδάκι τοποθετήθηκαν 2ml καλλιέργειας με 10⁵ κύτταρα ανά ml. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν τα δείγματα σε συγκέντρωση που προκάλεσε μέτρια κυτταροτοξικότητα στη δοκιμασία κυτταροτοξικότητας (βλέπε 3.6). Μετά από 48h⁸⁷ πραγματοποιήθηκε η συλλογή των κυττάρων. Συλλέχθηκαν τα κύτταρα με φυγοκέντρηση στις 1500rpm για 5min. Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και πραγματοποιήθηκε πλύση των κυττάρων με PBS και επαναιώρηση με ρυθμιστικό διάλυμα λύσης - Lysis Buffer (RIPA) που περιείχε αναστολείς πρωτεασών και επώση για 5min, ώστε να λυθούν τα κύτταρα. Τα διαλύματα φυγοκεντρήθηκαν στις 10.000rpm για 10min. Απομονώθηκε το υπερκείμενο των τριπλών δειγμάτων και αποθηκεύτηκε στους -20°C. Από το υπερκείμενο 40μL αναμείχθηκαν με 158μl ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης (20% γλυκερόλη, 0.5mM EDTA, 5mM διθειοθρεϊτόλη, 100mM HEPES, pH=7.5) και 2μl χρωμογόνου υποστρώματος κασπάσης, το οποίο είναι η αποπαΐνη ή αλλιώς Ac-DEVD-pNA (αγορασμένο από Eurogentec). Η τελική συγκέντρωση του υποστρώματος ήταν 100μM. Η μέθοδος στηρίζεται στην αποικοδόμηση του πεπτιδίου με αποτέλεσμα την απελευθέρωση της 4-νιτροανιλίνης (Εικόνα 89), η οποία απορροφά μέγιστα σε μήκος κύματος 408nm. Έτσι, τα δείγματα επώστηκαν στους 37°C για 6h, προκειμένου να ολοκληρωθεί η αντίδραση και ακολούθησε φωτομέτρηση στα 405nm.



Εικόνα 89: Δομή π-Νιτροανιλίνης

2.12 Απομόνωση RNA και RT-qPCR

Η απομόνωση του RNA έγινε σύμφωνα με τους Zepeda και Verdonk¹⁰⁵, οι οποίοι περιγράφουν μία τροποποίηση της μεθόδου απομόνωσης RNA σε ένα βήμα, των Chomczynski και Sacchi¹⁰⁶. Πιο αναλυτικά, τα κύτταρα συλλέχθηκαν μετά από 24h επώση με το υπό εξέταση δείγμα. Έπειτα, απομονώθηκαν με φυγοκέντρηση στις 1,000rpm για 5min. Ακολούθησε λύση των κυττάρων με ανάμειξή τους με κρύο διάλυμα λύσης (0.4M θειοκυανικό αμμώνιο, 0.8M θειοκυανική γουανιδίνη, 0.1M οξικό νάτριο (pH=5), 5%(v/v) γλυκερόλη, 38% (v/v) φαινόλη). Προστέθηκε χλωροφόρμιο και μετά από ανάδευση έγινε φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα (10,000rpm) για 5min. Συλλέχθηκε η υπερκείμενη υδατική φάση και προστέθηκε όγκος ισοπροπανόλης σε αναλογία 1/1. Ακολούθησε επώση στους 4°C για 12h, ώστε να αυξηθεί η ποσότητα του απομονωμένου RNA. Το RNA συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα για 10min. Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και έγινε πλύση με 70% αιθανόλη. Τα δείγματα RNA αφέθηκαν να ξηραθούν και έπειτα επαναιωρήθηκαν σε νερό απαλλαγμένο από RNases.

Η Real Time PCR πραγματοποιήθηκε σε LightCycler 2.0 System (Roche Molecular Systems, Inc.). Για την RT-qPCR (Reverse Transcription quantitative PCR) χρησιμοποιήθηκε το One-Step

RT PCR kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) με SYBR green φθορίζουσα χρωστική (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η έκφραση κάθε γονιδίου παρουσιάζεται ως σχετική έκφραση σε σύγκριση με το γονίδιο μάρτυρας να είναι το γονίδιο της β-ακτίνης (*ACTB*)¹⁰⁷. Τα γονίδια των οποίων η έκφραση ελέγχθηκε, ρυθμίζονται από τον Nrf2 και ήταν τα: *HO-1*, *NQO1* και *GCLC*. Ο προσδιορισμός της έκφρασης των γονιδίων αυτών έγινε μετά από 24h επώαση των κυττάρων με τα δείγματα. Τα δείγματα που δοκιμάστηκαν ήταν η ευγενόλη, οι ενώσεις 6 και 32 και τα εκχυλίσματα του δεντρολίβανου, του θυμαριού, της μορίνγκας, του φασκόμηλου.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε γονίδιο παρουσιάζονται στον Πίνακα 3

Γονίδιο	Πρόσθιος Εκκινητής	Ανάστροφος Εκκινητής
<i>ACTB</i> ¹⁰⁸	5'-AGAGCTACGAGCTGCCTGAC-3' ¹⁰⁸	5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3' ¹⁰⁸
<i>GCLC</i> ²³	5'-TGAGCATAGACACCATCATCAATG-3' ²³	5'-TAGTTCTCCAGATGCTCTCTTCTT-3' ²³
<i>HO-1</i> ²³	5'-AAGTTCAAGCAGCTCTACCGCT-3' ²³	5'GGGCAGAATCTTGCACCTTGTG-3' ²³
<i>NQO1</i> ¹⁰⁹	5'-CGCAGACCTTGTGATATCCAG-3' ¹⁰⁹	5'-CGTTTCTTCCATCCTTCCAGG-3' ¹⁰⁹

Πίνακας 3: Γονίδια και αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την RT-qPCR

2.13 Στατιστική ανάλυση

Όλες οι τιμές των αποτελεσμάτων στα πειράματα τα οποία επαναλήφθηκαν 3 φορές, παρουσιάζονται ως η μέση τιμή των 3 επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση (Standard Deviation – SD).

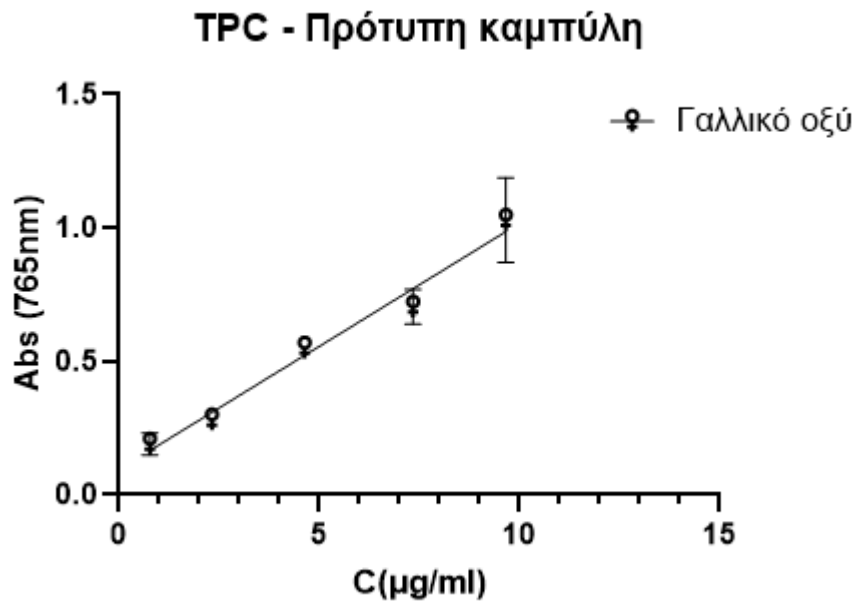
Η στατιστική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των λογισμικών SPSS (Kendall's tau-b, Pearson Correlation, Shapiro-Wilk, QQ Plots) (IBM Corp. Released 2019. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 26.0. Armonk, NY: IBM Corp)¹¹⁰ και GraphPad Prism (Linear Regression, Shappiro-Wilk, QQ Plots, Brown- Forsythe για δοκιμή ομοιογένειας, Unpaired t-test και F test, One way ANOVA, Holm-Sidak ή Dunnett's test για post-hoc ανάλυση¹¹¹) (GraphPad Prism version 8.0.1 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com)¹¹². Για την ανάλυση της γραμμικής παλινδρόμησης, του t-test και της One-Way ANOVA ελέγχθηκε σε κάθε περίπτωση η κανονική κατανομή με Shappiro-Wilk ($\alpha=0.05$) και η κατανομή στο QQ διάγραμμα, καθώς και η ομοιογένεια με το test Brown-Forsythe.

3. Αποτελέσματα

3.1 Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο

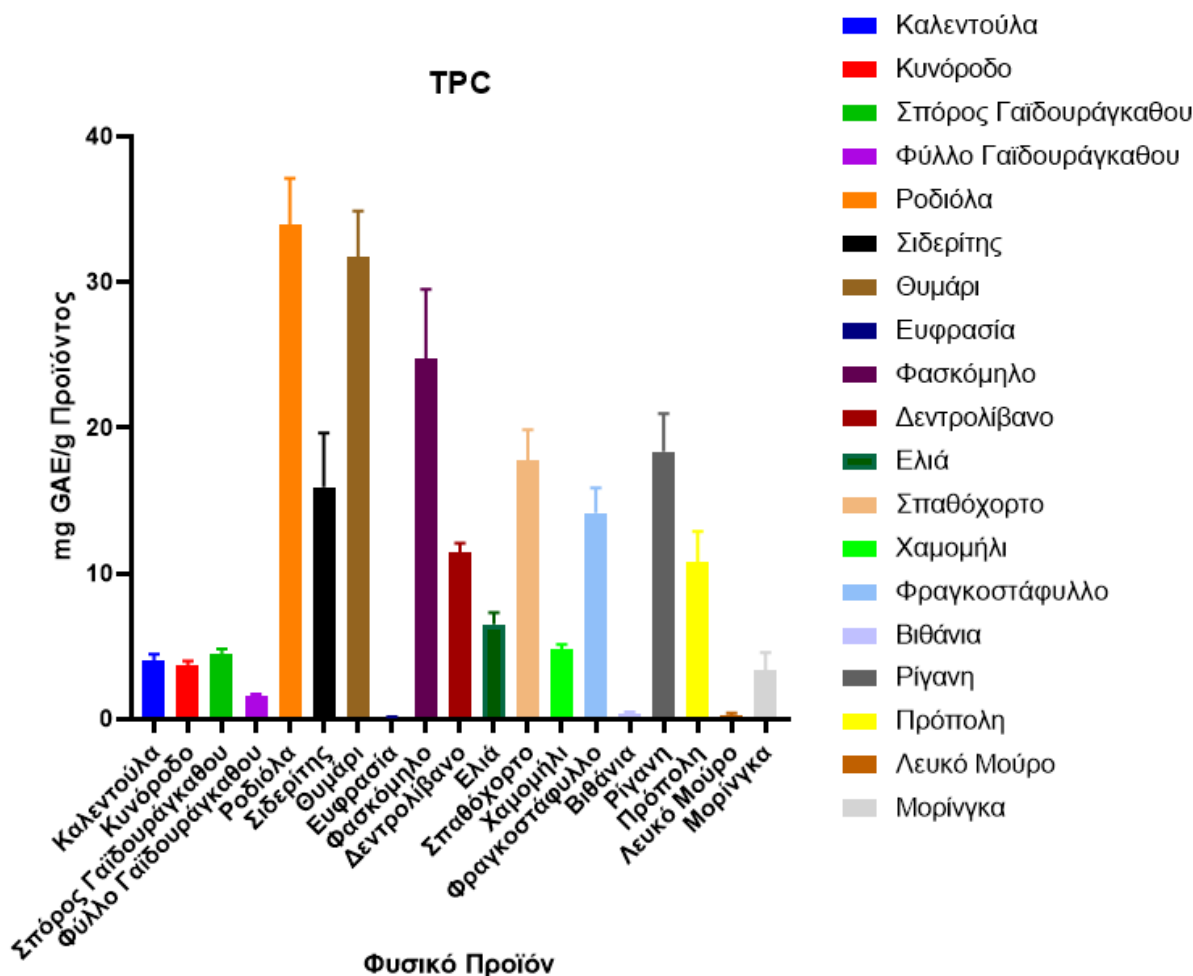
Το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο (Total Phenolic Content – TPC) κάθε φυσικού προϊόντος προσδιορίστηκε με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος, καθώς το TPC εκφράζεται ως ισοδύναμες μονάδες γαλλικού οξέος. Για τα φυσικά προϊόντα των οποίων τα αποτελέσματα δεν αντιστοιχούν στο γραμμικό τμήμα της πρότυπης καμπύλης πραγματοποιήθηκε η κατάλληλη συμπύκνωση ή αραιώση και έπειτα έγινε ο υπολογισμός των αποτελεσμάτων, ώστε να προσδιοριστεί το φαινολικό περιεχόμενο.

Η πρότυπη καμπύλη του γαλλικού οξέος, παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 1.



Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη Γαλλικού οξέος. Προσδιορίστηκε στις συγκεντρώσεις 0.77µM, 2.32µM, 4.64µM, 7.35µM, 9.67µM. Παρουσιάζονται οι μέσες τιμές των αποτελεσμάτων των τριών επαναλήψεων ± τις τυπικές αποκλίσεις κάθε τιμής.

Με βάση την πρότυπη καμπύλη, προσδιορίστηκε το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο κάθε φυσικού προϊόντος σε mg GAE/g προϊόντος στο εκχύλισμα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 4. Στο Ιστόγραμμα 1 παρουσιάζονται συγκεντρωμένα τα αποτελέσματα της TPC δοκιμής για κάθε φυσικό προϊόν.



Ιστόγραμμα 1: Παρουσιάζονται τα περιεχόμενα φαινολικών ουσιών των φυσικών προϊόντων, εκφρασμένα σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο προϊόντος (mg GAE / g Προϊόντος). Η Βοσβέλια απουσιάζει από το ιστόγραμμα καθώς παρουσίασε μηδενικό περιεχόμενο σε φαινολικές ουσίες βάσει της δοκιμής. Στο ιστόγραμμα οι στήλες αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή των αποτελεσμάτων των τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση.

Φυσικό προϊόν	mg GAE/ g Προϊόντος
Βιθάνια	0.44 ± 0.07
Βοσβέλια	0
Γαϊδουράγκαθο (Σπόρος)	4.50 ± 0.33
Γαϊδουράγκαθο (Φύλλο)	1.63 ± 0.10

<i>Δεντρολίβανο</i>	11.43 ± 0.65
<i>Ελιά</i>	6.51 ± 0.82
<i>Ευφρασία</i>	0.10 ± 0.05
<i>Θυμάρι</i>	31.74 ± 3.13
<i>Καλέντουλα</i>	4.06 ± 0.42
<i>Κυνόροδο</i>	3.69 ± 0.32
<i>Λευκό Μούρο</i>	0.22 ± 0.19
<i>Μορίνγκα</i>	3.35 ± 1.21
<i>Πρόπολη</i>	10.79 ± 2.10
<i>Ρίγανη</i>	18.37 ± 2.61
<i>Ροδιόλα</i>	33.91 ± 3.22
<i>Σπαθόχορτο</i>	17.73 ± 2.13
<i>Τσάι του Βουνού</i>	15.93 ± 3.72
<i>Φασκόμηλο</i>	24.71 ± 4.80
<i>Φραγκοστάφυλλο</i>	14.17 ± 1.70
<i>Χαμομήλι</i>	4.81 ± 0.31

Πίνακας 4: Το περιεχόμενο κάθε φυσικού προϊόντος σε φαινολικές ουσίες, εκφρασμένο σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά mg/ml. Κάθε τιμή προέρχεται από τη μέση τιμή των αποτελεσμάτων των τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση (SD)

Η One-Way ANOVA χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθεί εάν υπάρχει σημαντική διαφορά στα φαινολικά περιεχόμενα των φυτών. Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στο TPC μεταξύ των φυτών ($F(18,37)=75.63$, $p<0.0001$). Η post hoc ανάλυση Holm-Sidak απέδειξε πως η ροδιόλα (33.91 ± 3.22 mg GAE/ g Προϊόντος) και το θυμάρι (31.74 ± 3.13 mg GAE/ g Προϊόντος) έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά με τα υπόλοιπα φυτά ($p<0.05$ σε κάθε περίπτωση) αλλά όχι μεταξύ τους, ως προς το TPC, με αυτά τα δύο να έχουν το πλουσιότερο περιεχόμενο σε φαινολικές ουσίες.

3.2 Αντίδραση με Θειόλες

Τα αποτελέσματα σάρωσης μήκους κύματος για τις 41 ενώσεις συνοψίζονται στον πίνακα 5, μαζί με την διαφορά οπτικής πυκνότητας ανά λεπτό (dOD/min) για τα πρώτα 21min αλλά και για τα 41min. Επιλέχθηκαν αυτοί οι χρόνοι καθώς κάποιες ενώσεις φτάνουν την αντίδραση σε πλατώ πριν τα 41 min όχι όμως και πριν τα 21min, ενώ άλλες (ένωση 36) δεν αρχίζουν την αντίδραση μέχρι το πέρας 21 ή και 31min. Άλλες ενώσεις δρουν καθόλη τη διάρκεια και η αντίδραση φτάνει σε πλατώ στα 41min. Οι ενώσεις 4, 13, 17, 18, 20 δεν αντέδρασαν με την κυστεαμίνη. Η διαφορά οπτικής πυκνότητας στο πέρας του χρόνου οφείλεται στην αντίδραση της ένωσης με την κυστεαμίνη.

Ένωση	Μήκος κύματος (nm)	dOD/min Για 21min	dOD/min Για 41min	k ₂ M ⁻¹ s ⁻¹
1	320	1.48*10 ⁻³	0.76*10 ⁻³	2.37
2	332	1.67*10 ⁻³	0.85*10 ⁻³	3.46
3	371	1.24*10 ⁻³	0.83*10 ⁻³	0.36
5	360	1.9*10 ⁻³	1.36*10 ⁻³	0.6
6	382,5	2.29*10 ⁻³	1.54*10 ⁻³	0.61
7	354	3.48*10 ⁻³	1.93*10 ⁻³	1.76
8	349	6.81*10 ⁻³	3.46*10 ⁻³	3.52
9	339	0.52*10 ⁻³	0.44*10 ⁻³	0.86
10	369,5	0.43*10 ⁻³	0.42*10 ⁻³	0.14
11	339	1.14*10 ⁻³	0.83*10 ⁻³	0.51
12	331,5	0.91*10 ⁻³	0.59*10 ⁻³	0.87
14	379	6.24*10 ⁻³	4.29*10 ⁻³	1.28
15	350	3.52*10 ⁻³	3.85*10 ⁻³	3.40
16	320	1.67*10 ⁻³	0.88*10 ⁻³	0.57
19	396,5	1.1*10 ⁻³	0.61*10 ⁻³	0.18

21	389,5	$1.33 \cdot 10^{-3}$	$0.71 \cdot 10^{-3}$	0.17
22	432	$0.95 \cdot 10^{-3}$	$0.56 \cdot 10^{-3}$	0.06
23	379	$1.81 \cdot 10^{-3}$	$1.29 \cdot 10^{-3}$	0.32
24	340,5	$2.95 \cdot 10^{-3}$	$1.78 \cdot 10^{-3}$	1.4
25	449,5	$1.29 \cdot 10^{-3}$	$1.1 \cdot 10^{-3}$	0.08
26	347	$4.19 \cdot 10^{-3}$	$2.63 \cdot 10^{-3}$	1.55
27	361	$2.29 \cdot 10^{-3}$	$1.95 \cdot 10^{-3}$	0.92
28	339	$1.14 \cdot 10^{-3}$	$0.93 \cdot 10^{-3}$	0.48
29	457	$2.86 \cdot 10^{-3}$	$1.59 \cdot 10^{-3}$	0.29
30	424,5	$1.24 \cdot 10^{-3}$	$0.73 \cdot 10^{-3}$	0.15
31	379,5	$6.67 \cdot 10^{-3}$	$5.07 \cdot 10^{-3}$	1.51
32	390	$2.48 \cdot 10^{-3}$	$1.56 \cdot 10^{-3}$	0.42
33	371,5	$4.29 \cdot 10^{-3}$	$2.46 \cdot 10^{-3}$	0.88
34	444,5	$2.24 \cdot 10^{-3}$	$1.37 \cdot 10^{-3}$	0.25
35	405	$0.47 \cdot 10^{-3}$	$0.32 \cdot 10^{-3}$	0.12
36	365,5	0	$0.37 \cdot 10^{-3}$	0.12
37	335,5	$0.52 \cdot 10^{-3}$	$0.76 \cdot 10^{-3}$	0.53
38	410	$5.95 \cdot 10^{-3}$	$3.56 \cdot 10^{-3}$	1.09
39	416	$3.67 \cdot 10^{-3}$	$2.32 \cdot 10^{-3}$	0.56
40	368,5	$3.14 \cdot 10^{-3}$	$1.90 \cdot 10^{-3}$	0.40
41	378,5	$3.76 \cdot 10^{-3}$	$2.15 \cdot 10^{-3}$	0.39

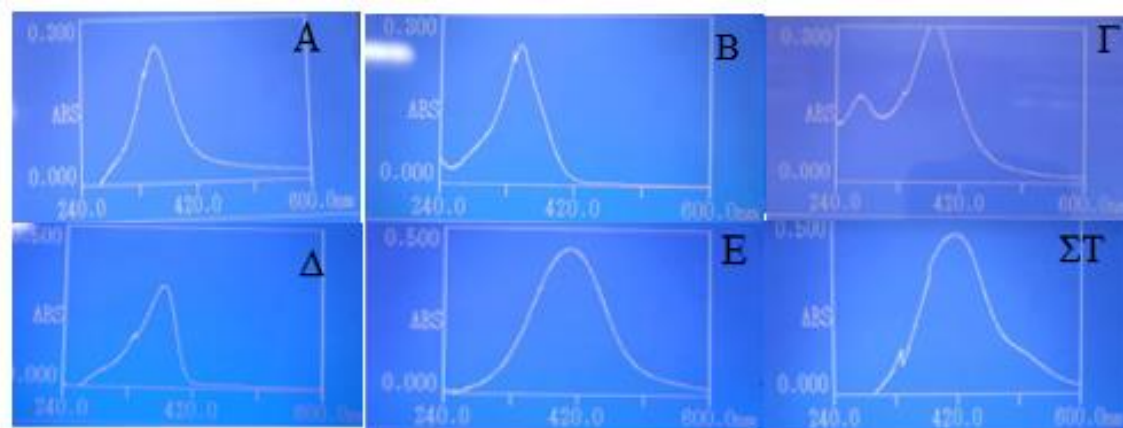
Πίνακας 5: Παρουσιάζεται η διαφορά απορρόφησης των δειγμάτων ανά λεπτό για τα πρώτα 21min και για τα 41min, στο μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης (δεύτερη στήλη) και η τιμή της σταθεράς αντίδρασης k_2 με την κυστεαμίνη για κάθε ένωση

Η δραστικότητα των ενώσεων με 3 ομάδες φθορίου στον φαινολικό δακτύλιο είχαν $k_2 > 1.5$, με τις ενώσεις 2 και 8 έχουν τις 2 υψηλότερες σταθερές αντίδρασης.

Με βάση τα αποτελέσματα στον πίνακα 5, επιλέχθηκαν 6 δραστικές ενώσεις για δοκιμή αντίδρασης με την L-κυστεΐνη, την N-ακετυλο-κυστεΐνη (N-acetyl cysteine – NAC) και το θειογλυκολικό. Η διαλογή των ενώσεων έγινε με βάση την k_2 της ένωσης για την αντίδραση με την κυσταμίνη και έπειτα βάσει της διαφοράς οπτικής πυκνότητας ανά λεπτό. Για τις αντιδράσεις αυτές επιλέχθηκαν ενώσεις ποικίλης δραστικότητας. Επιλέχθηκε η ένωση με τη μεγαλύτερη k_2 (ένωση 8), ενώσεις μέτριας δραστικότητας (14 και 38), η ένωση 39 με χαμηλή k_2 , καθώς και ενώσεις με μέτρια προς υψηλή k_2 (ένωση 7 και 31). Οι σταθερές αντίδρασης των ενώσεων αυτών για τις αντιδράσεις τους με το θειογλυκολικό οξύ, τη NAC, την κυστεΐνη και την κυσταμίνη δίνονται στον πίνακα 6.

Ένωση	Cysteine	Cysteamine	NAC	Thioglycolate
7	7.75	1.76	0.54	0.14
8	32.74	3.52	0.13	0.08
14	1.83	1.28	0.26	0.03
31	4.38	1.51	0	0.34
38	1.54	1.09	2.56	0.02
39	1.8	0.56	0	0.19

Πίνακας 6: Οι σταθερές k_2 των ενώσεων 7, 8, 14, 31, 38, 39 για τις αντιδράσεις τους με τις ενώσεις Κυσταμίνη, Θειογλυκολικό οξύ, NAC, Κυστεΐνη.

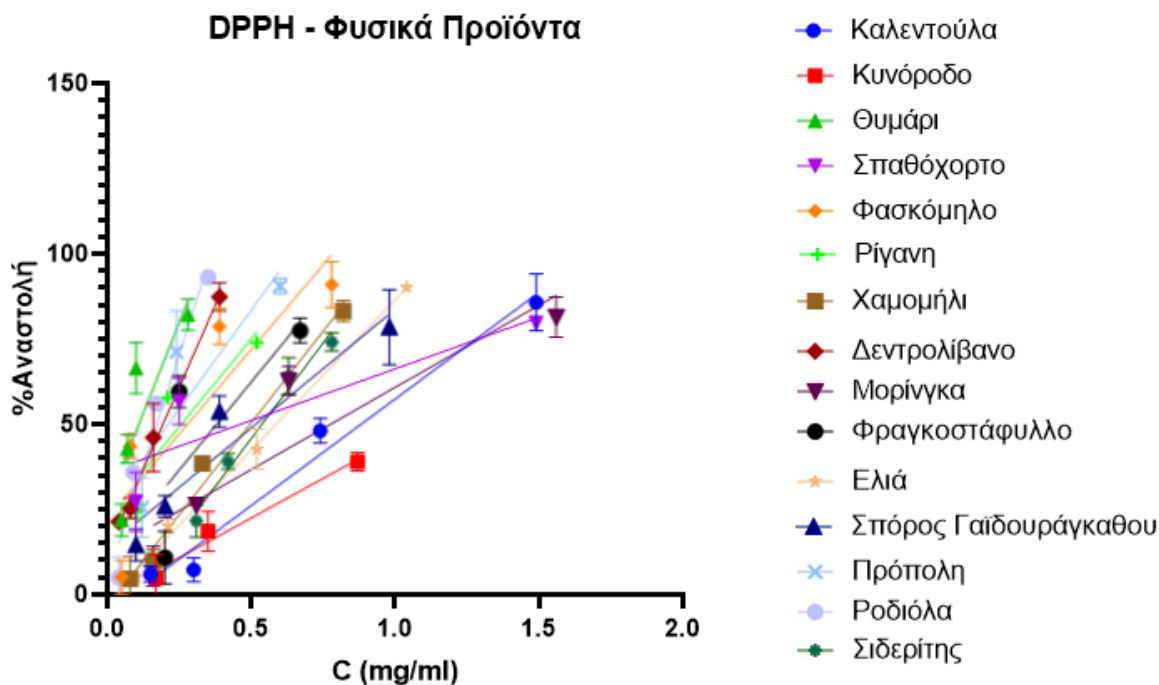


Εικόνα 90: Τα αποτελέσματα σάρωσης μήκους κύματος. Στην εικόνα A παρουσιάζεται η σάρωση για την ένωση 7, στη B για την ένωση 8, στη Γ για την 14, στη Δ για την 31, στην E για την 38, στη ΣΤ για την 39

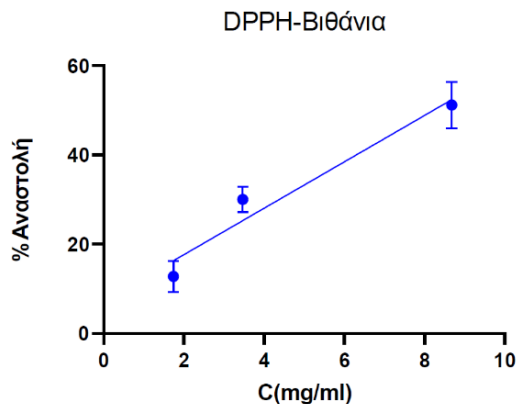
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά η σειρά δραστηριότητας των ενώσεων αλλάζει ανάλογα την αντίδραση για την οποία εξετάζεται η ένωση. Για τις αντιδράσεις με Κυστεΐνη και Κυστεαμίνη επιβεβαιώθηκε η μονοτονικότητα των σημείων και πραγματοποιήθηκε Kendall Tau b τεστ. Τα αποτελέσματα του τεστ φανερώνουν πως υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των δύο σειρών δραστηριότητας ($t_b=0.867$, $p=0.015$). Βέβαια, το μέγεθος των δειγμάτων είναι μικρό και η συσχέτιση αυτή χρειάζεται να εξεταστεί σε περισσότερα δείγματα.

3.3 Αναστολή DPPH

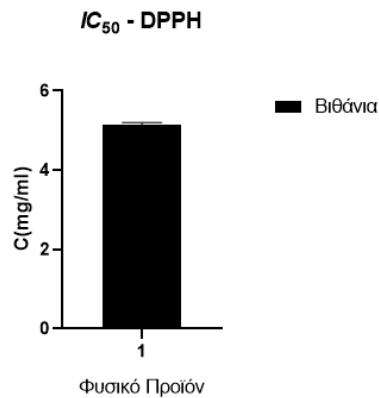
Από τα φυσικά προϊόντα δοκιμάστηκαν όλα για την εξουδετέρωση ρίζας DPPH. Από τις δοκιμές αυτές απροσδιόριστη έμεινε η IC_{50} της βοσβέλιας, της ευφρασίας, του λευκού μούρου και του φύλλου του γαϊδουράγκαθου, με τη βοσβέλια να εμφανίζει μηδενική δράση στην εξουδετέρωση της ρίζας. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα: Διαγράμματα 2 και 3, Πίνακας 7, Ιστόγραμμα 2, Ιστόγραμμα 3. Η IC_{50} της βιθάνιας προσδιορίστηκε σημαντικά μεγαλύτερη, από των υπολοίπων φυσικών προϊόντων και έτσι χάριν ευκρίνειας, τα αποτελέσματά τις παρουσιάζονται σε ξεχωριστά διαγράμματα.



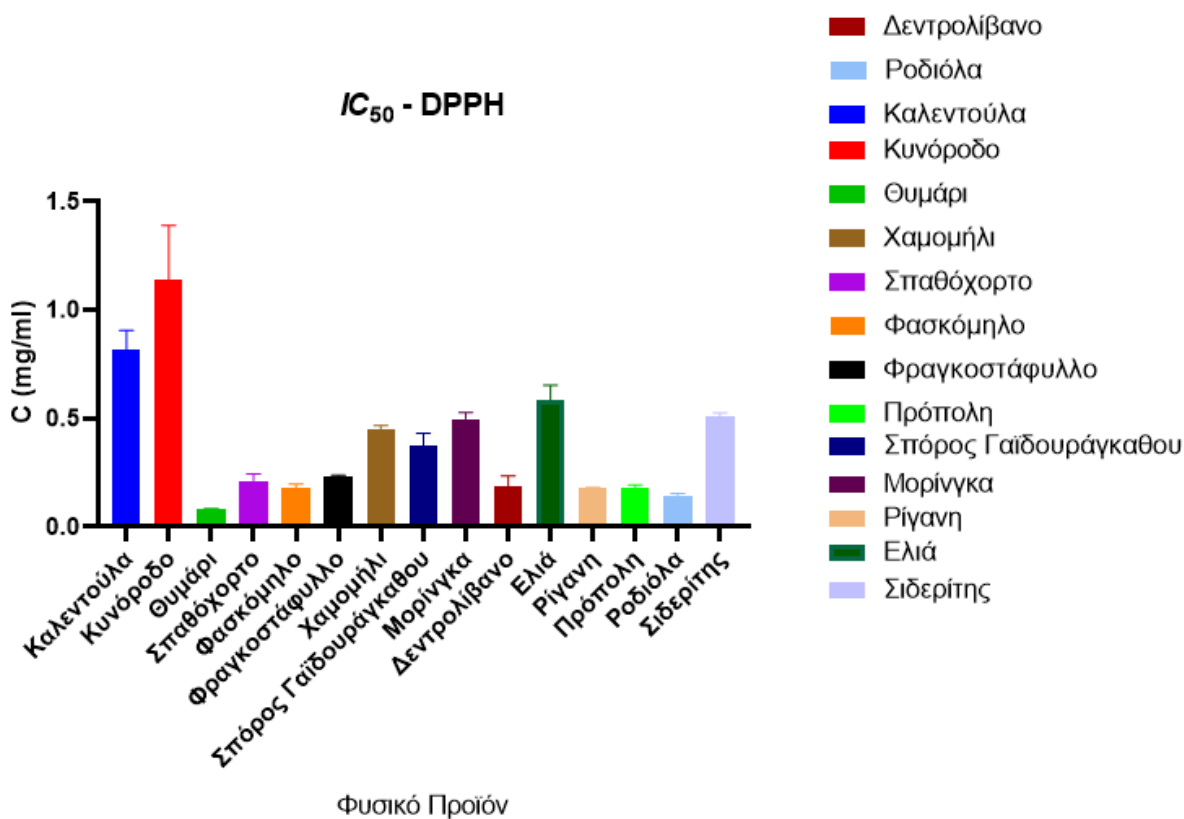
Διάγραμμα 2: Απεικονίζονται οι γραφικές παραστάσεις (με τη γραμμή τάσης) για τη σχέση της περιεκτικότητας του διαλύματος σε εκχύλισμα (mg/ml) και της επί τοις εκατό αναστολή της ρίζας DPPH. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται οι γραφικές παραστάσεις των αποτελεσμάτων των εκχυλισμάτων των φυσικών προϊόντων: Καλέντουλα, Κυνόροδο, Θυμάρι, Σπαθόχορτο, Φασκόμηλο, Φραγκοστάφυλλο, Σπόρος Γαϊδουράγκαθου, Πρόπολη, Δεντρολίβανο, Ροδιόλα, Ρίγανη, Ελιά, Χαμομήλι, Μορίνγκα.



Διάγραμμα 3: Γραφική παράσταση αναστολής του DPPH από τη Βιθάνια



Ιστόγραμμα 2: IC₅₀ της Βιθάνιας



Ιστόγραμμα 3: Παρουσιάζονται οι τιμές IC₅₀ αναστολής της ρίζας DPPH των φυσικών προϊόντων εκφρασμένες σε mg/ml

Φυσικό Προϊόν	IC_{50} (mg/ml)
Βιθάνια	5.15 ± 0.05
Γαϊδουράγκαθο Σπόρος	0.376 ± 0.057
Δεντρολίβανο	0.189 ± 0.046
Ελιά	0.587 ± 0.066
Θυμάρι	0.079 ± 0.006
Καλεντούλα	0.820 ± 0.086
Κυνόροδο	1.140 ± 0.251
Μορίνγκα	0.498 ± 0.03
Πρόπολη	0.178 ± 0.011
Ρίγανη	0.181 ± 0.002
Ροδιόλα	0.141 ± 0.013
Σιδερίτης	0.51 ± 0.016
Σπαθόχορτο	0.214 ± 0.031
Φασκόμηλο	0.181 ± 0.018
Φραγκοστάφυλλο	0.236 ± 0.002
Χαμομήλι	0.450 ± 0.017

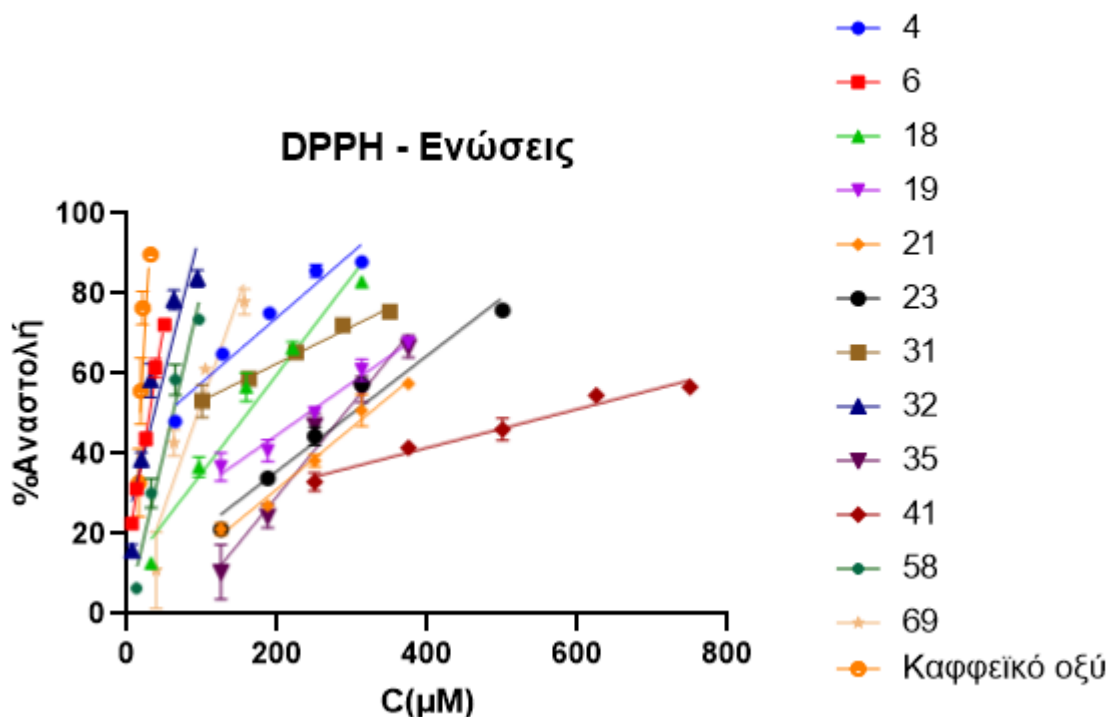
Πίνακας 7: Παρουσιάζονται τα Φυσικά προϊόντα για τα οποία προσδιορίστηκε η IC_{50} (για την αναστολή της ρίζας DPPH), καθώς και η μέση τιμή της IC_{50} σε mg/ml, για το έκαστο προϊόν.

Τη μικρότερη IC_{50} , άρα και την μεγαλύτερη ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH• την εμφάνισε το θυμάρι με $IC_{50}=0.079 \pm 0.006$ mg/ml, το αμέσως πιο δραστικό ήταν η ροδιόλα και ακολουθούν η πρόπολη, η ρίγανη, το φασκόμηλο, και το δεντρολίβανο, το σπαθόχορτο και το φραγκοστάφυλλο, ο σπόρος του γαϊδουράγκαθο, το χαμομήλι, η μορίνγκα και ο σιδερίτης, η ελιά, η καλέντουλα και το κυνόροδο και τέλος η βιθάνια.

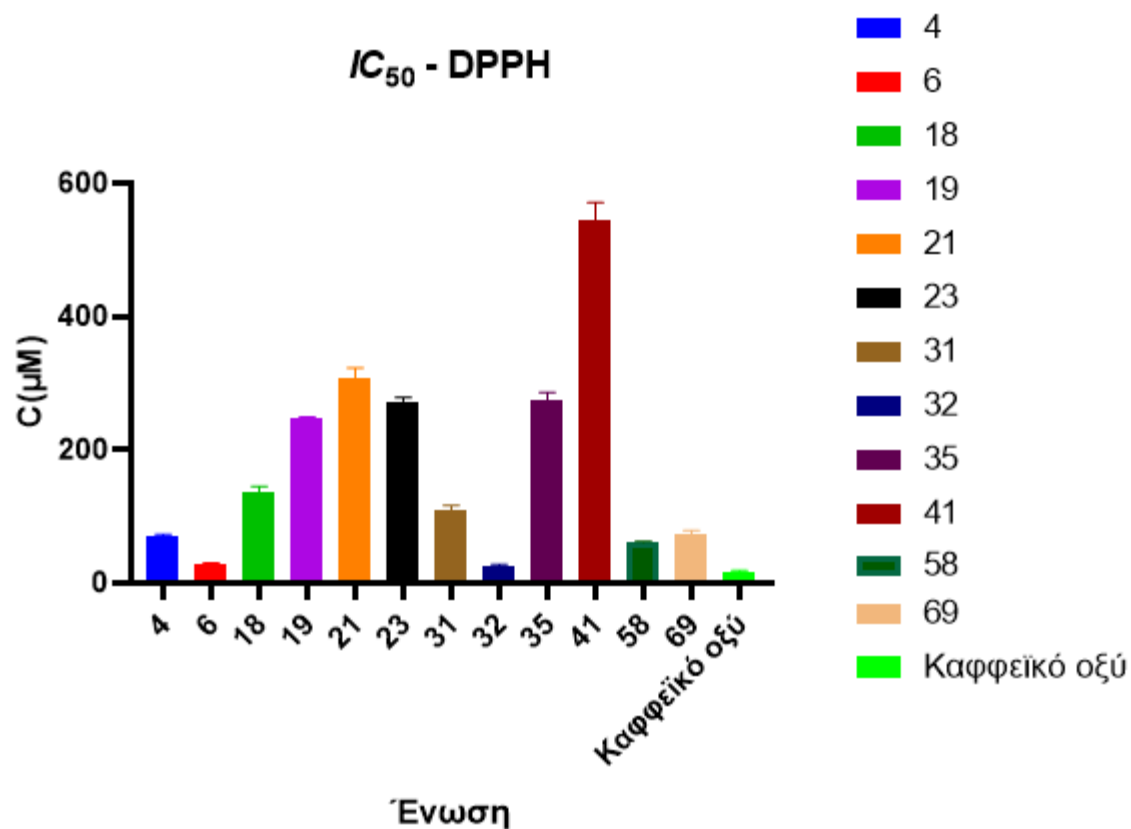
Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στις IC_{50} μεταξύ των μέσων των IC_{50} φυσικών προϊόντων ($F(15,30)=556.2$, $p<0.0001$). Η post hoc ανάλυση του Dunnett απέδειξε πως η βιθάνια έχει τη μεγαλύτερη IC_{50} (5.15 ± 0.05 mg/ml) με στατιστικά σημαντική διαφορά από τις IC_{50} όλων των υπολοίπων φυσικών προϊόντων ($p<0.0001$ σε κάθε περίπτωση σύγκρισης), ενώ τα εκχυλίσματα,

τα οποία δεν εμφάνισαν στατιστική διαφορά από το πιο ισχυρό δείγμα (του θυμαριού) κατηγοριοποιήθηκαν ως ισχυρά.

Από τις συνθετικές ενώσεις, οι ενώσεις που έδειξαν να εξουδετερώνουν τις ρίζες DPPH βέλτιστα ήταν οι εξής: Το καφεϊκό οξύ (θετικός μάρτυρας) και οι ενώσεις 4, 6, 18, 19, 21, 23, 31, 32, 35, 41, 58, 69. Από αυτές την μέγιστη δράση την εμφάνισαν οι 6, η 32 και το καφεϊκό οξύ. Οι μέσες τιμές IC_{50} για την εξουδετέρωση της DPPH των ενώσεων παρατίθενται στον Πίνακα 8, ενώ τα γραφήματα παρουσιάζουν την σχέση συγκέντρωσης της ένωσης και της επί τοις εκατό εξουδετέρωσης της ρίζας.



Διάγραμμα 4: Απεικονίζονται οι γραφικές παραστάσεις αναστολής της ρίζας DPPH από τις ενώσεις 4, 6, 18, 19, 21, 23, 31, 32, 35, 41, 58, 68, 69. Τα γραφήματα είναι φτιαγμένα με τις μέσες τιμές των αποτελεσμάτων των τριών επαναλήψεων τις μεθόδου ± την τυπική απόκλιση κάθε τιμής.



Ιστόγραμμα 4: Παρουσιάζονται οι τιμές IC₅₀ ± SD για την αναστολή της ρίζας DPPH από τις ενώσεις

Ένωση	IC ₅₀ (µM)
4	70.43 ± 2.82
6	28.85 ± 1.27
18	136.54 ± 8.79
19	248.15 ± 1.14
21	307.59 ± 15.09
23	272.63 ± 5.66
32	25.63 ± 2.47

35	273.69 ± 12.43
41	543.97 ± 26.63
58	60.95 ± 1.36
69	73.54 ± 5.2
Καφεϊκό οξύ	17.67 ± 1.07

Πίνακας 8: Παρατίθενται, για κάθε ένωση, και οι τιμές μέσες τιμές IC_{50} ± την τυπική απόκλιση

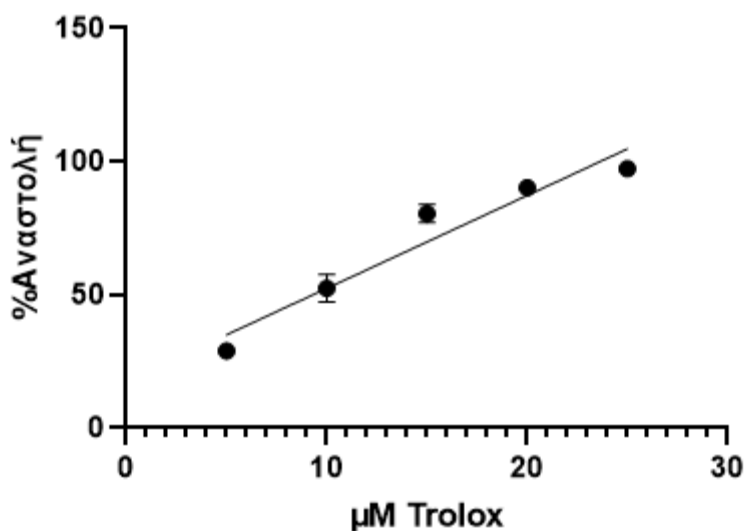
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν unpaired t-test μεταξύ των αποτελεσμάτων του καφεϊκού οξέος και των υπόλοιπων ενώσεων. Με Unpaired t-test απεδείχθει πως το καφεϊκό οξύ διαφέρει σημαντικά από όλες τις ενώσεις με τα αποτελέσματα των test να είναι τα εξής: με την ένωση 4 ($t(4)=30.31$, $p<0.0001$), με την 6 ($t(4)=11.64$, $p=0.0003$), με την 18 ($t(4)=23.24$, $p<0.0001$), την 19 ($t(4)=255.6$, $p<0.0001$), την 21 ($t(4)=33.2$, $p<0.0001$), την 23 ($t(4)=76.67$, $p<0.0001$), την ένωση 32 ($t(4)=5.116$, $p=0.0069$), την 35 ($t(4)=35.54$, $p<0.0001$), την 41 ($t(4)=34.21$, $p<0.0001$), την 58 ($t(4)=43.3$, $p<0.0001$) και με την 69 ($t(4)=18.22$, $p<0.0001$).

Στο καφεϊκό οξύ προσδιορίστηκε η μικρότερη IC_{50} , η οποία υπολογίστηκε να είναι 17.67 ± 1.07 μM . Τις αμέσως μικρότερες IC_{50} την εμφάνισε η 32 και η 6 με 25.63 ± 2.47 και 28.85 ± 1.27 μM αντίστοιχα, οι οποίες μεταξύ τους δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($t(4)=2.009$, $p=0.1149$).

3.4 Αναστολή ABTS

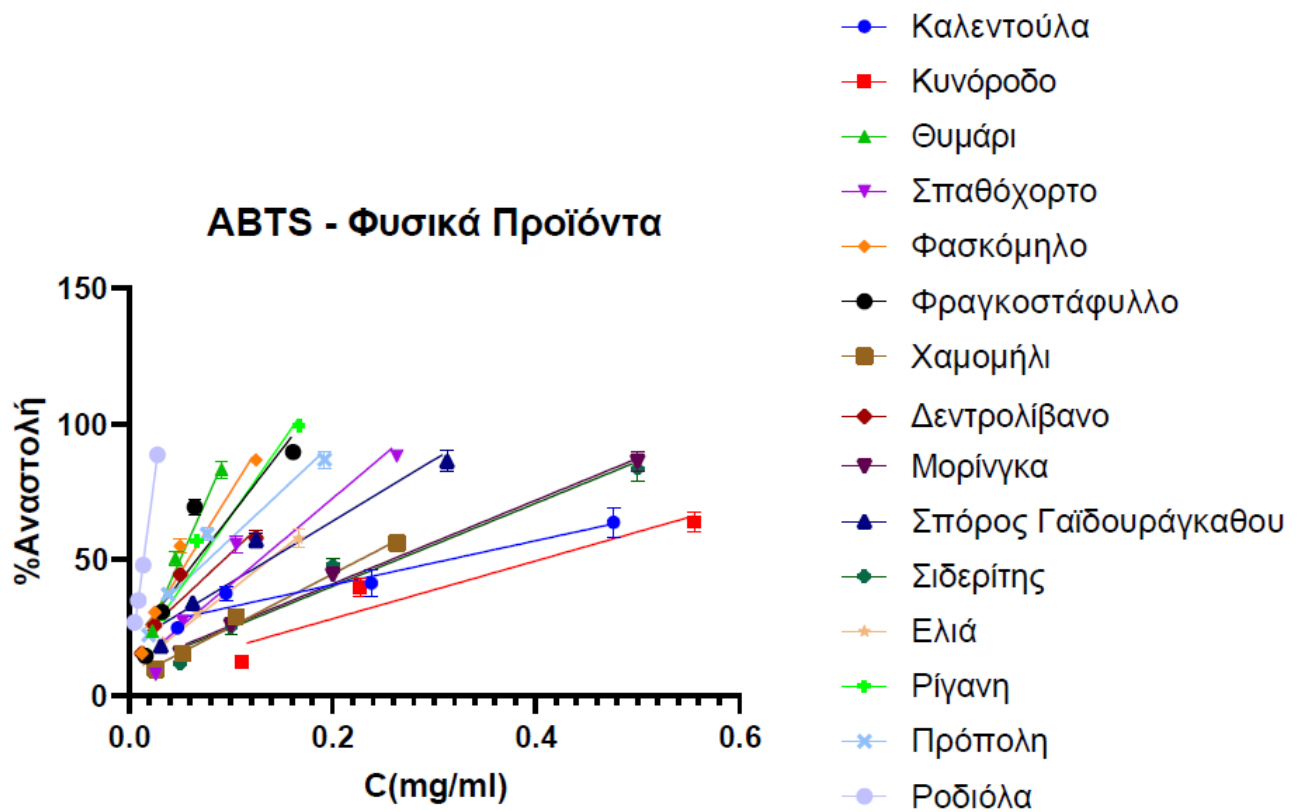
Αρχικά προσδιορίστηκε η αναστολή της ρίζας ABTS• από το Trolox. Το Trolox χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή της πρότυπης καμπύλης σύμφωνα με την οποία προσδιορίστηκαν τα φυσικά προϊόντα ως ισοδύναμα μM Trolox/g Προϊόντος, (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity – TEAC). Για την πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις 5, 10, 15, 20, 25 μM . Το Διάγραμμα 5 παρουσιάζει την πρότυπη καμπύλη, η οποία δημιουργείται με τις μέσες τιμές των τριών επαναλήψεων του πειράματος ± την τυπική απόκλιση (Standard Deviation – SD) κάθε μέσου.

ABTS - Πρότυπη καμπύλη

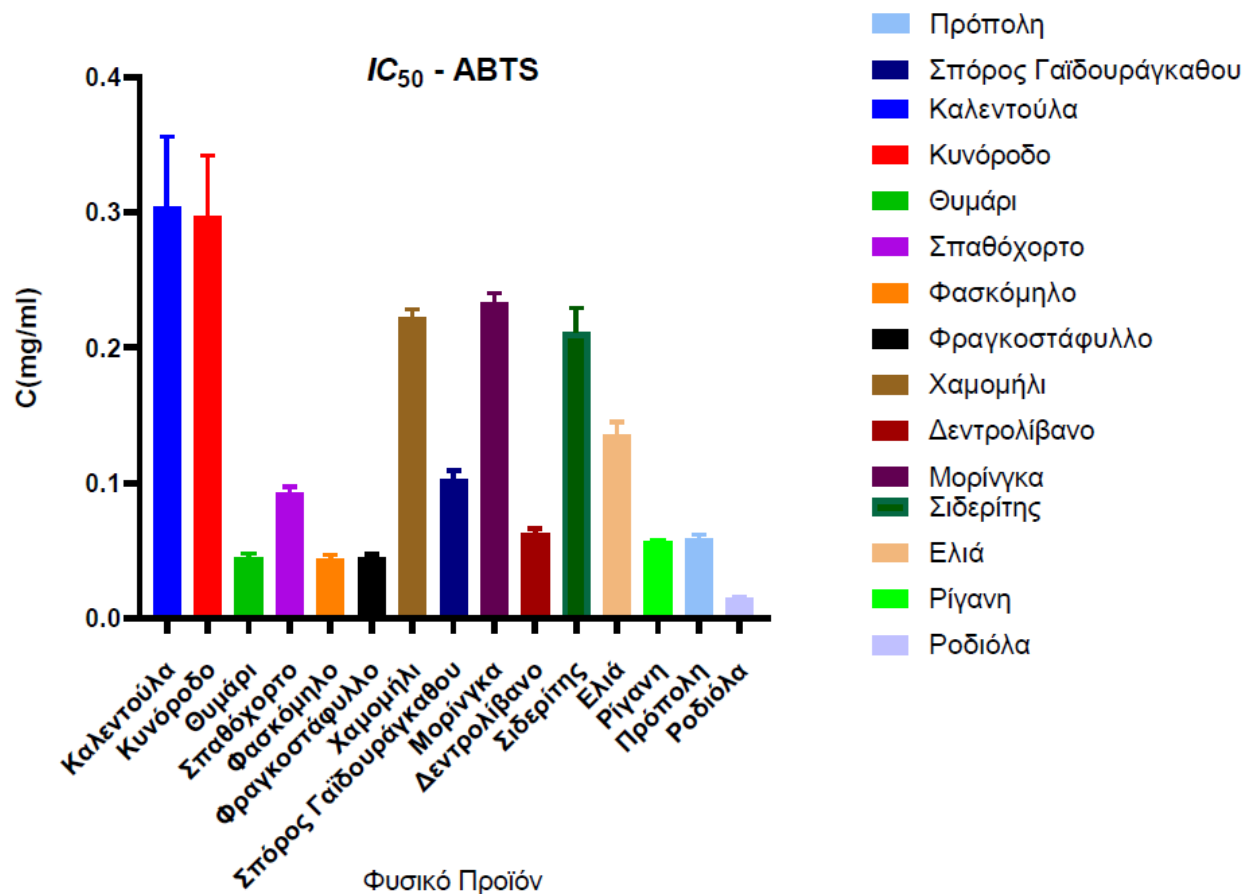


Διάγραμμα 5: Πρότυπη καμπύλη αναστολής της ρίζας ABTS από το Trolox.

Δοκιμάστηκαν όλα τα φυσικά προϊόντα για την ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τη ρίζα του ABTS. Από τα 19 φυσικά προϊόντα, στα 15 υπολογίστηκε η IC_{50} (Πίνακας 9, Ιστόγραμμα 5), ενώ στα υπόλοιπα λόγω χαμηλής δραστηριότητας η IC_{50} , παρέμεινε απροσδιόριστη. Τα 4 αυτά προϊόντα ήταν η βιθάνια, η βοσβέλια, η ευφρασία και το φύλλο του γαϊδουράγκαθου. Τα αποτελέσματα των φυσικών προϊόντων στην εξουδετέρωση της ρίζας ABTS•, παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 6.



Διάγραμμα 6: Απεικονίζονται τα γραφήματα των αποτελεσμάτων εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS• από τα φυσικά εκχυλίσματα, με τη μέση αναστολή υπολογισμένη από τις 3 επαναλήψεις ± την τυπική απόκλιση.



Ιστόγραμμα 5: Απεικονίζονται οι μέσες τιμές IC₅₀ των προϊόντων για την αναστολή της ρίζας ABTS• ± την SD

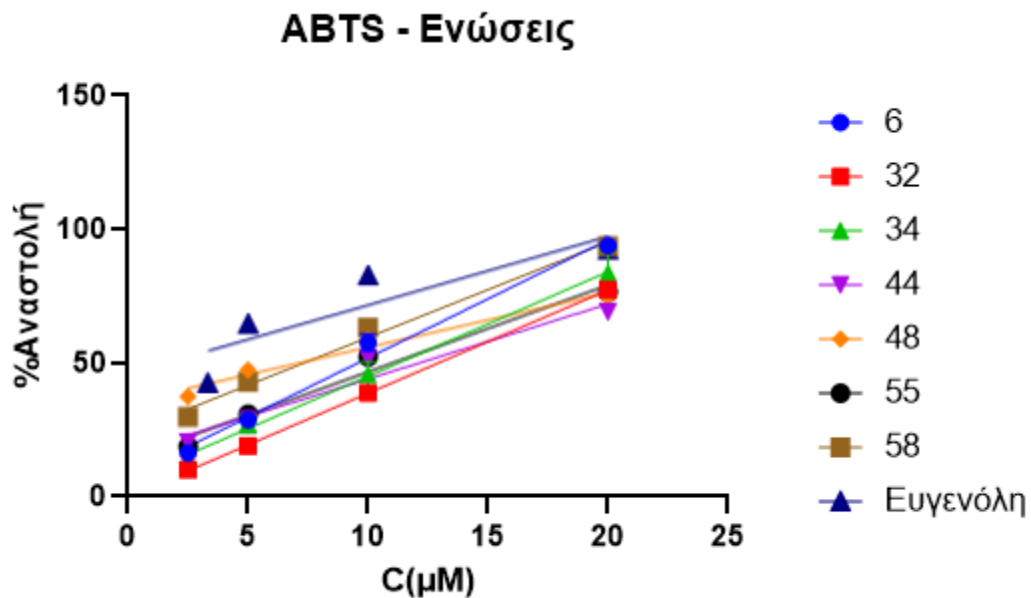
Φυσικό Προϊόν	IC ₅₀ (mg / ml)	μmol Trolox/g
Γαϊδουράγκαθο (Σπόρος)	0.103 ± 0.007	162.39 ± 23.61
Δεντρολίβανο	0.063 ± 0.003	314.05 ± 28.35
Ελιά	0.136 ± 0.009	112.28 ± 5.59
Θυμάρι	0.045 ± 0.003	472.05 ± 55.27
Καλέντουλα	0.304 ± 0.052	32.54 ± 13.34
Κυνόροδο	0.297 ± 0.045	33.63 ± 10.07
Μορίνγκα	0.233 ± 0.007	49.8 ± 3.41

Πρόπολη	0.059 ± 0.003	339.34 ± 22.75
Ρίγανη	0.057 ± 0.001	353.5 ± 15.16
Ροδιόλα	0.015 ± 0.001	1698.34 ± 83.87
Σιδερίτης	0.212 ± 0.018	58.74 ± 9.4
Σπαθόχορτο	0.093 ± 0.005	189.21 ± 8.02
Φασκόμηλο	0.044 ± 0.003	487.27 ± 19.61
Φραγκοστάφυλλο	0.045 ± 0.002	464 ± 4.48
Χαμομήλι	0.222 ± 0.006	53.62 ± 1.23

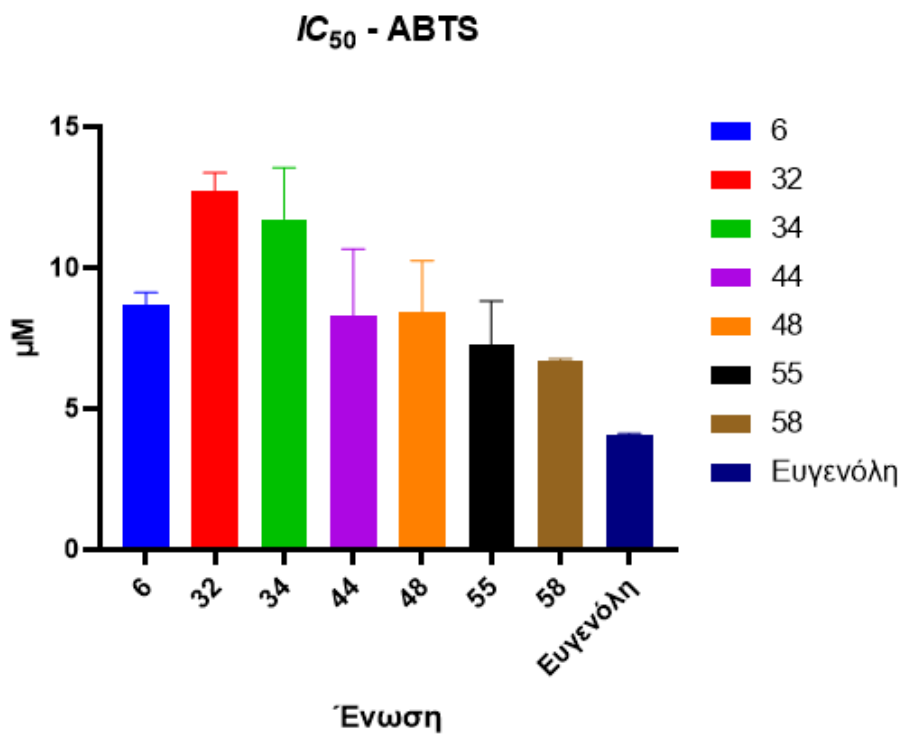
Πίνακας 9: Παρατίθεται η μέση IC_{50} (σε mg προϊόντος / ml αντίδρασης) κάθε εκχυλίσματος ως προς την ιδιότητα αναστολής της ρίζας ABTS•, τα μmol ισοδύναμα Trolox ανά γραμμάριο προϊόντος καθώς και η τυπική απόκλιση κάθε τιμής.

Τη μέγιστη αναστολή της ρίζας ABTS• από τα φυσικά προϊόντα την επέδειξε η ροδιόλα με $IC_{50}=0.015 \pm 0.001\text{mg/ml}$ ή $1698.34 \pm 83.87 \mu\text{mol Trolox/g}$ φυσικού προϊόντος. Ακολούθησαν το θυμάρι, με το φασκόμηλο και το φραγκοστάφυλλο, η ρίγανη με την πρόπολη και το δεντρολίβανο, το σπαθόχορτο με το σπόρο του σαΐδουράγκαθου, η ελιά, ο σιδερίτης με το χαμομήλι και τη μορίγκα και το κυνόροδο με την καλέντουλα.

Από όλες τις συνθετικές ενώσεις που δοκιμάστηκαν, τη μέγιστη ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS• την εμφάνισαν οι ενώσεις 6, 32, 34, 44, 48, 55, 58 (Ιστόγραμμα 6, Πίνακας 10, Διάγραμμα 7). Για κάθε ένωση προσδιορίστηκε η IC_{50} αναστολής της ABTS• και έγινε σύγκριση της τιμής αυτής με την IC_{50} της ευγενόλης (Θετικός Μάρτυρας). Οι συγκρίσεις έγιναν με ξεχωριστά unpaired t-test. Τα αποτελέσματα των t-test είναι: μεταξύ αποτελεσμάτων με τη χρήση ευγενόλης και ένωσης 6 ($t(4)=19.18$, $p<0.0001$), ευγενόλης και ένωσης 32 ($t(4)=23.06$, $p<0.0001$), μεταξύ ευγενόλης και ένωσης 34 ($t(4)=7.276$, $p=0.0019$), μεταξύ ευγενόλης και ένωσης 44 ($t(4)=3.06$, $p=0.0377$) μεταξύ ευγενόλης και ένωσης 48 ($t(4)=4.070$, $p=0.0152$), μεταξύ ευγενόλης και ένωσης 55 ($t(4)=3.67$, $p=0.0214$), μεταξύ ευγενόλης και 58 ($t(4)=52.69$, $p<0.0001$).



Διάγραμμα 7: Απεικόνιση των αποτελεσμάτων % Αναστολής της ρίζας ABTS συναρτήσει της συγκέντρωσης των ενώσεων 6, 32, 34, 44, 48, 55, 58, 67



Ιστόγραμμα 6: Απεικονίζονται οι IC₅₀ (μM) των ενώσεων για την αναστολή της ρίζας ABTS•

<i>Ένωση</i>	<i>IC₅₀</i> (<i>μM</i>)
6	8.7 ± 0.42
32	12.72 ± 0.65
34	11.73 ± 1.82
44	8.28 ± 2.39
48	8.4 ± 1.85
55	7.3 ± 1.53
58	6.70 ± 0.06
<i>Ευγενόλη</i>	4.06 ± 0.05

Πίνακας 10: Αναγράφονται οι τιμές IC_{50} (μM) των ενώσεων για την αναστολή της ABTS•

3.5 Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας

Για την κυτταροτοξικότητα ο πρώτος ποιοτικός έλεγχος έδειξε τις επιδράσεις των ενώσεων και των φυτικών εκχυλισμάτων στα κύτταρα στις 24h και στις 48h επώασης. Από όλες τις ενώσεις στη δοκιμασία κυτταρικής αύξησης και κασπάσης χρησιμοποιήθηκαν αυτές με ήπια τοξική δράση στα κύτταρα. Στον πίνακα 11 και στον πίνακα 12 παρουσιάζονται οι επιδράσεις όλων των φυτικών εκχυλισμάτων και των ενώσεων με ήπια τοξική δράση.

Φυσικό προϊόν	Επίδραση (24h)	Επίδραση (48h)	C (mg/ml)
Βιθάνια	δ	δ+	1.39
Βιθάνια	δ	δ++	2.78
Βιθάνια	δ+	+++	5.56
Βοσβέλια	+	+++	1
Βοσβέλια	++	+++	2
Βοσβέλια	++++	++++	4
Γαϊδουράγκαθο Σπόρος		+	1.56

Γαϊδουράγκαθο Σπόρος		++	3.125
Γαϊδουράγκαθο Σπόρος		++	6.25
Γαϊδουράγκαθο Φύλλο		+	1.923
Γαϊδουράγκαθο Φύλλο	+	++	3.85
Γαϊδουράγκαθο Φύλλο	+	++	7.69
Δεντρολίβανο	+	++	0.625
Δεντρολίβανο	+	+++	1.25
Δεντρολίβανο	++	+++	2.5
Ελιά	+	+	0.83
Ελιά	++	++	1.67
Ελιά	+++	+++	3.33
Ευφρασία			1.04
Ευφρασία			2.08
Ευφρασία			4.17
Θυμάρι	+	++	1.14
Θυμάρι	++	++	2.27
Θυμάρι	+++	+++	4.55
Καλέντουλα	+++	+++	1.19
Καλέντουλα	++++	++++	2.38
Καλέντουλα	++++	++++	4.76
Κυνόροδο			1.39
Κυνόροδο			2.78
Κυνόροδο			5.56

Λευκό μούρο			1.04
Λευκό μούρο			2.08
Λευκό μούρο			4.17
Μορίνγκα	++	+++	2.5
Μορίνγκα	++++	++++	5
Μορίνγκα	++++	++++	10
Πρόπολη	++++	+++	0.96
Πρόπολη	++++	++++	1.92
Πρόπολη	++++	++++	3.85
Ρίγανη			0.83
Ρίγανη	++	++	1.67
Ρίγανη	++	+++	3.33
Ροδιόλα	δ+	++	1.19
Ροδιόλα	δ+	++	2.38
Ροδιόλα	δ++	++	4.76
Σιδερίτης	+++	+++	2.5
Σιδερίτης	+++	+++	5
Σιδερίτης	+++	++++	10
Σπαθόχορτο	++	++	1.32
Σπαθόχορτο	++	++	2.63
Σπαθόχορτο	+++	+++	5.36
Φασκόμηλο	+	++	0.625
Φασκόμηλο	++	+++	1.25
Φασκόμηλο	+++	++++	2.5
Φραγκοστάφυλλο	++	++	0.81

Φραγκοστάφυλλο	++	+++	1.61
Φραγκοστάφυλλο	++	+++	3.23
Χαμομήλι			1.34
Χαμομήλι	++++	++++	2.68
Χαμομήλι	++++	++++	5.36

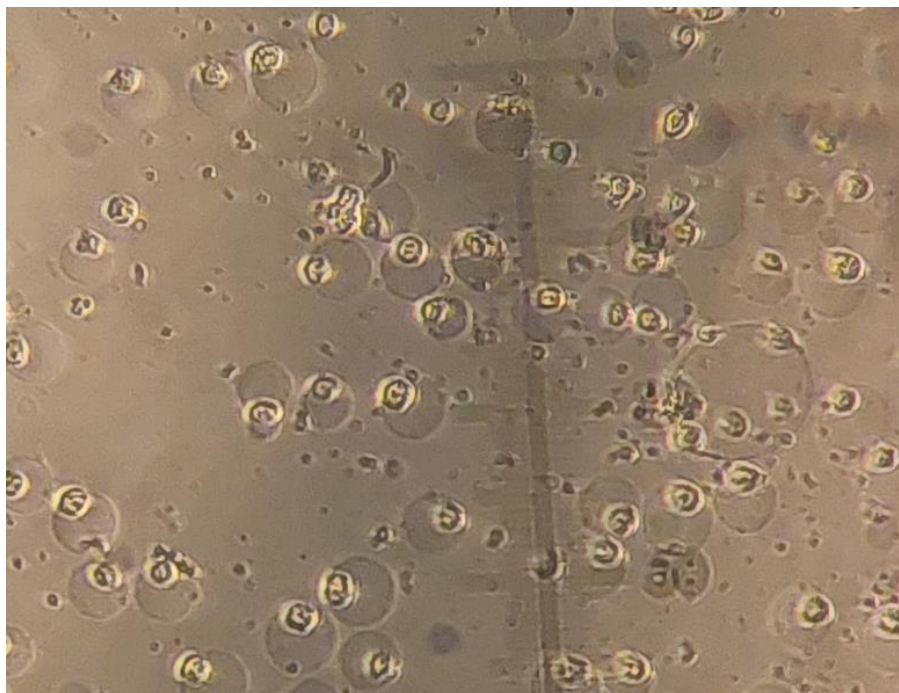
Πίνακας 11: Παρουσιάζονται οι επιδράσεις των φυσικών εκχυλισμάτων στα κύτταρα, μετά από το πέρας 24h και 48h επώασης. Για κάθε φυσικό προϊόν δοκιμάστηκαν 3 συγκεντρώσεις

Ένωση	Επίδραση (24h)	Επίδραση (48h)	C (mM)
6	++	+++	0.05
7	++	+++	0.05
8		++	0.05
9	++	+++	0.05
10	++	++	0.05
13	++	++	0.05
16	δ+	+	0.05
18			0.05
23	+	++	0.05
32	+	++	0.05
33		++	0.05
38	δ++	+++	0.05
47	++	+++	0.05
57	++	++	0.05
61	δ	++	0.05
64		+++	0.05

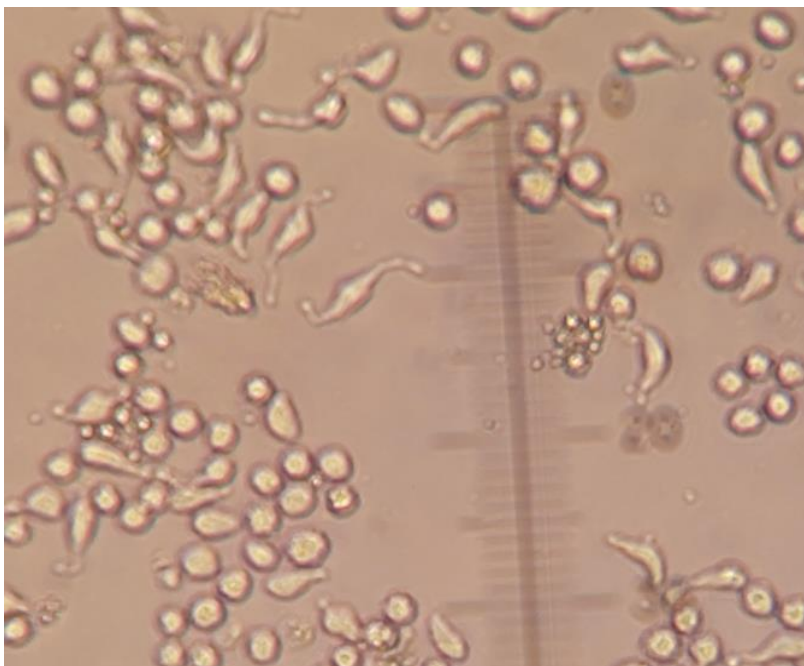
70	δ	++	0.05
----	---	----	------

Πίνακας 12: Παρουσιάζονται οι επιδράσεις των ενώσεων στα κύτταρα μετά το πέρας 24h και 48h επώασης. Κάθε ένωση δοκιμάστηκε σε συγκέντρωση 0.05mM

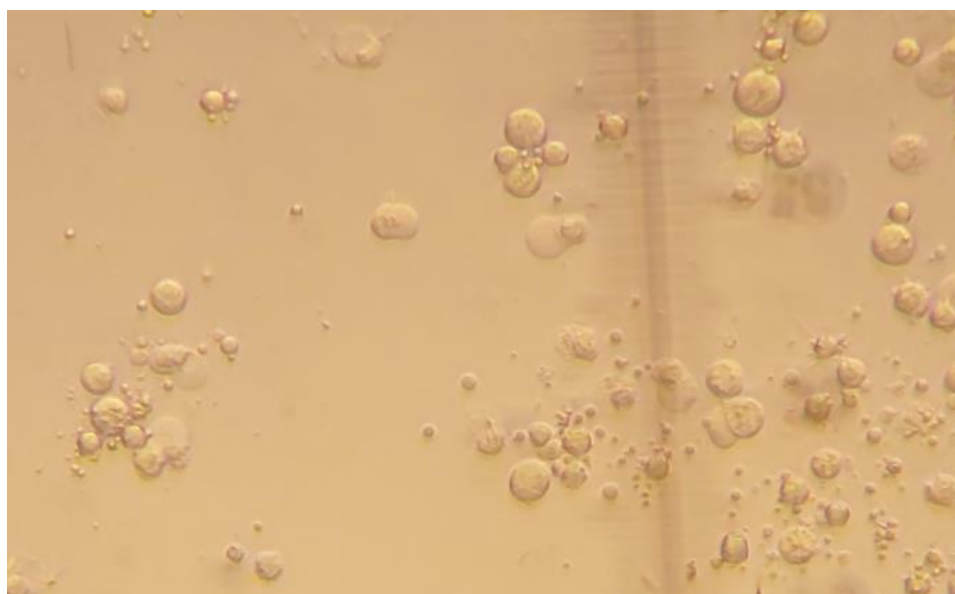
Στη συνέχεια παρατίθενται εικόνες που αντιπροσωπεύουν κάθε κατάσταση επίδρασης (+ έως ++++ και δ), οι εικόνες είναι ενδεικτικές και οι παρατηρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο σύνολο της καλλιέργειας και όχι στα απομονωμένα τμήματα των εικονών. Φωτογραφίες από τις υπόλοιπες δοκιμασίες παρατίθενται στο Παραρτημα Α: Κυτταρα



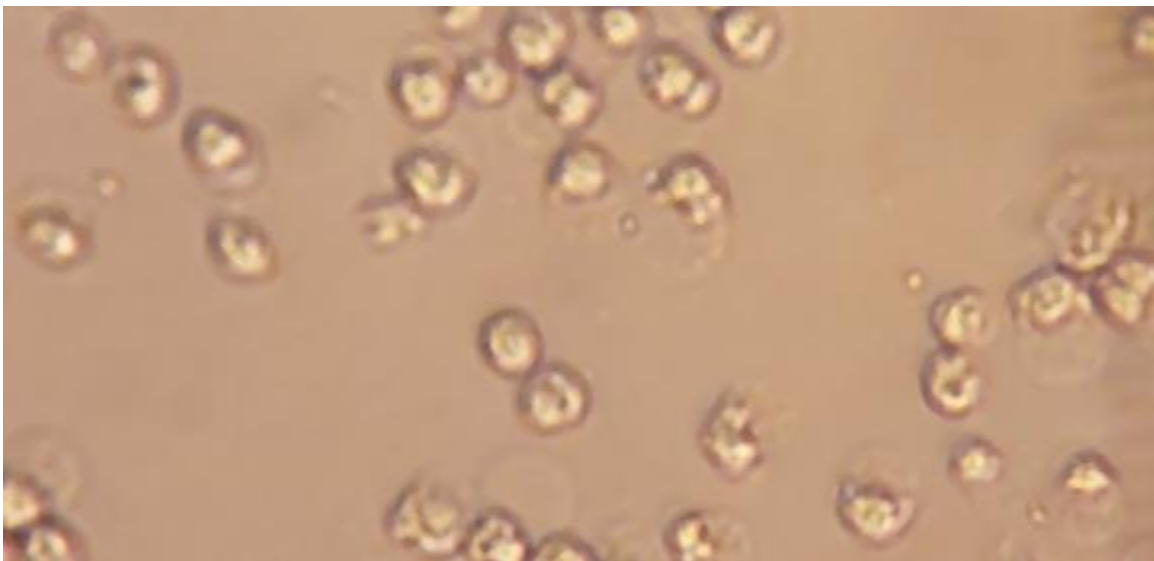
Εικόνα 91: Μεγέθυνση x840. Κύτταρα K562 μετά από 24h επώασης με εκχύλισμα καλέντουλας (C=4.7619mg/ml). Εντοπίζονται πολλά διογκωμένα κύτταρα, κατάσταση ++++



Εικόνα 92: Μεγέθυνση x840. K562 κύτταρα μετά από επόαση με εκχύλισμα βιθάνιας ($C=1.39\text{mg/ml}$) για 24h. Εντοπίζεται διαφοροποίηση του σχήματος των κυττάρων σε κύτταρα που μοιάζουν με ινοβλάστες ή δρεπανοκύτταρα και λίγα αποπτωτικά κύτταρα (κατάσταση δ+). Επίσης εντοπίζονται πολλά φυσιολογικά κύτταρα



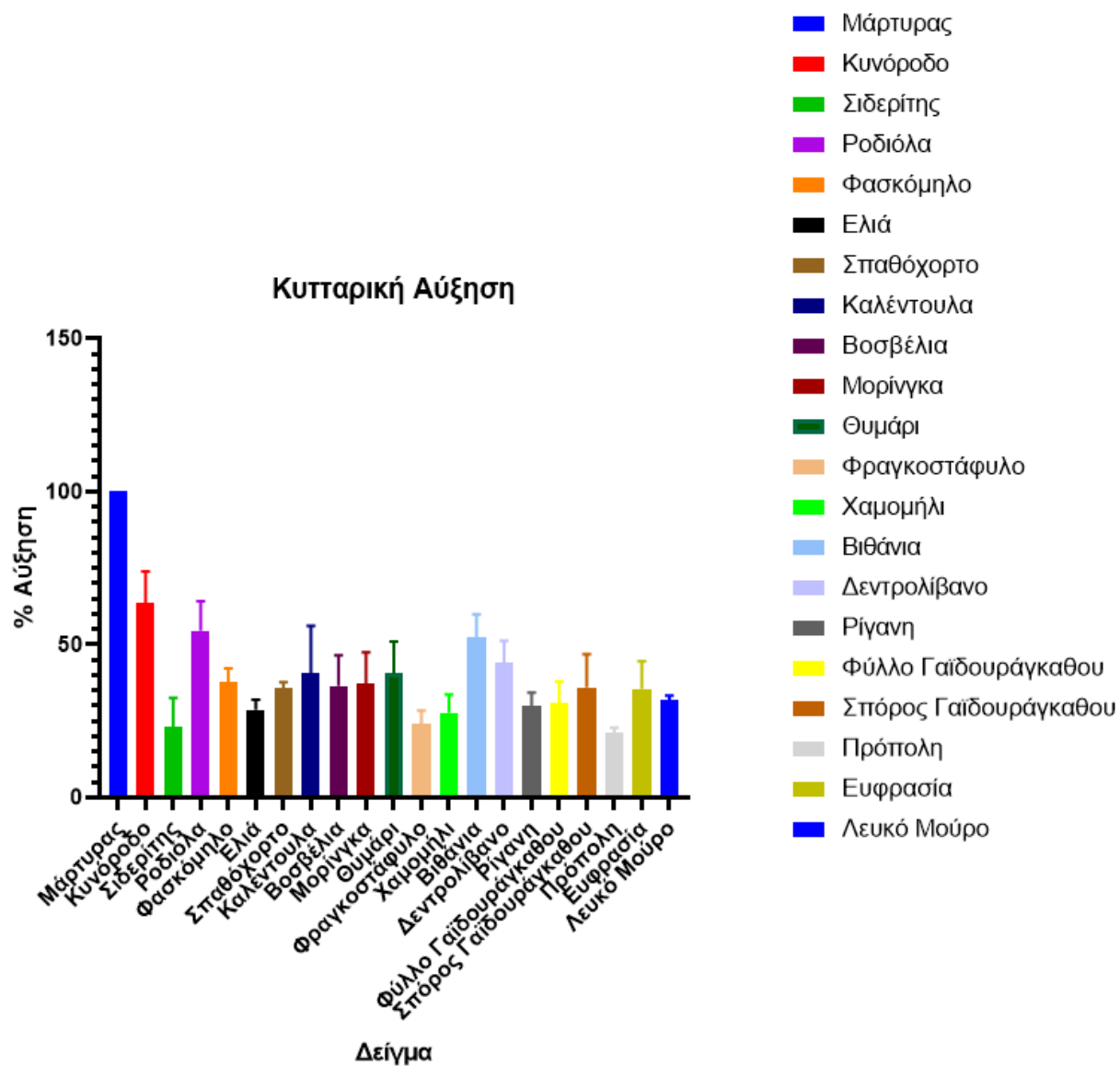
Εικόνα 93: Μεγέθυνση x840. K562 κύτταρα μετά από επόαση με εκχύλισμα ελιάς ($C=3.33\text{mg/ml}$) για 24h. Εντοπίζονται κύτταρα φυσιολογικά, διογκωμένα και νεκρωτικά καθώς και συρρικνωμένα αποπτωτικά., κατάσταση +++



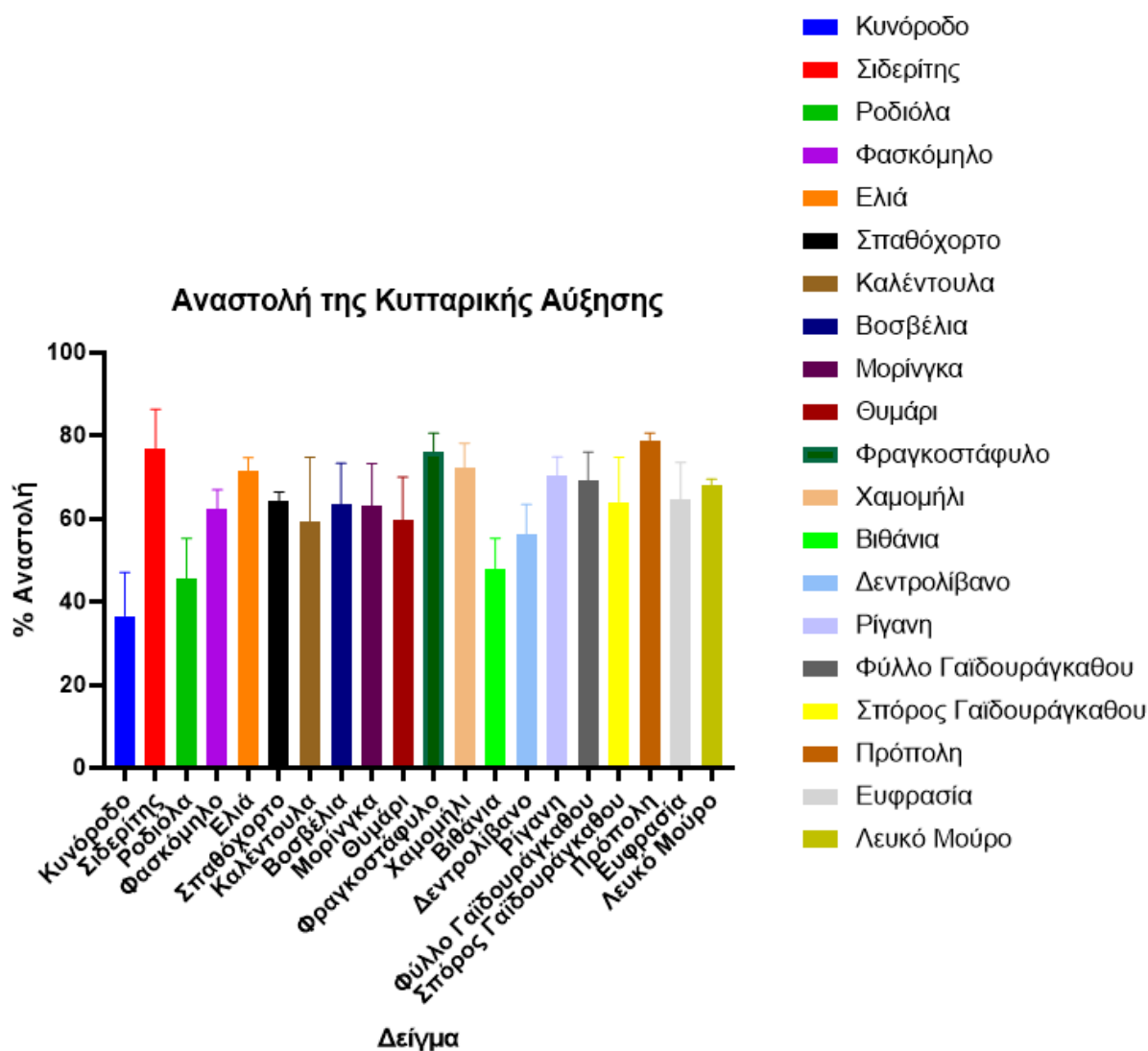
Εικόνα 94: Μεγέθυνση x840. K562 μετά από επόαση με εκχύλισμα φασκόμηλου (C=1.25mg/ml) για 24h. Εμφανίζονται κύτταρα διογκωμένα, πριν τον κυτταρικό θάνατο, όμως εμφανίζονται και αρκετά φυσιολογικά κύτταρα (κατάσταση ++)

3.6 Δοκιμασία κυτταρικής αύξησης

Δοκιμάστηκαν όλα τα φυσικά εκχυλίσματα για την ικανότητά τους να επηρεάζουν την αύξηση του πληθυσμού των κυττάρων (Ιστόγραμμα 7). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως επί τοις εκατό κυτταρική αύξηση σε σύγκριση με το μάρτυρα, ο οποίος αντιπροσωπεύει το 100% και ως επί τοις εκατό αναστολή της κυτταρικής αύξησης (Ιστόγραμμα 8), (Πίνακας 13).



Ιστόγραμμα 7 Παρουσιάζεται η % κυτταρική αύξηση (σε σύγκριση με το μάρτυρα) μετά από 48h επώασης των κυττάρων με το κάθε φυσικό προϊόν



Ιστόγραμμα 8: Παρουσιάζεται η % αναστολή της αύξησης των κυττάρων (συγκριτικά το μάρτυρα) μετά από 48h επώασης των κυττάρων με το κάθε φυσικό προϊόν

Η One Way ANOVA έδειξε ότι υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ των μέσων στην % κυτταρική αύξηση αλλά και στην % αναστολή με $(F(20,42)=14.43, p<0.0001)$ και $(F(19,40)=5.272, p<0.0001)$ αντίστοιχα. Η πολλαπλή σύγκριση του Dunnett μεταξύ των δειγμάτων και του μάρτυρα απέδειξε ότι η κυτταρική αύξηση είναι στατιστικά σημαντικά μικρότερη με τη χρήση των δειγμάτων $p<0.0001$ σε κάθε σύγκριση δείγματος με το μάρτυρα.

Φυσικό Προϊόν	Συγκέντρωση (mg/ml)	% Κυτταρική Αύξηση	% Αναστολή κυτταρικής αύξησης
---------------	---------------------	--------------------	-------------------------------

Βιθάνια	0.93	52.33 ± 7.55	47.67 ± 7.55
Βοσβέλια	0.17	36.56 ± 9.86	63.44 ± 9.86
Γαϊδουράγκαθο (Σπόρος)	2.08	36.02 ± 0.79	63.98 ± 0.79
Γαϊδουράγκαθο (Φύλλο)	2.56	30.91 ± 6.95	69.09 ± 6.95
Δεντρολίβανο	0.21	43.91 ± 7.30	56.09 ± 7.30
Ελιά	0.56	28.67 ± 3.29	71.33 ± 3.29
Ευφρασία	2.78	35.48 ± 8.98	64.52 ± 8.98
Θυμάρι	1.52	40.50 ± 10.51	59.5 ± 10.51
Καλέντουλα	0.20	40.68 ± 15.45	59.32 ± 15.45
Κυνόροδο	1.85	63.44 ± 10.49	36.56 ± 10.49
Λευκό Μούρο	2.78	31.90 ± 1.35	68.1 ± 1.35
Μορίγγκα	0.42	37.10 ± 10.30	62.9 ± 10.30
Πρόπολη	0.32	21.15 ± 1.73	78.85 ± 1.73
Ρίγανη	1.11	29.75 ± 4.57	70.25 ± 4.57
Ροδιόλα	0.93	54.48 ± 9.65	45.52 ± 9.65
Σιδερίτης	1.67	23.12 ± 9.45	76.88 ± 9.45
Σπαθόχορτο	0.22	35.66 ± 2.04	64.34 ± 2.04
Φασκόμηλο	0.42	37.63 ± 4.59	62.37 ± 4.59
Φραγκοστάφυλο	1.08	23.92 ± 4.44	76.08 ± 4.44
Χαμομήλι	1.75	27.78 ± 5.92	72.22 ± 5.92
Μάρτυρας	-	100	0

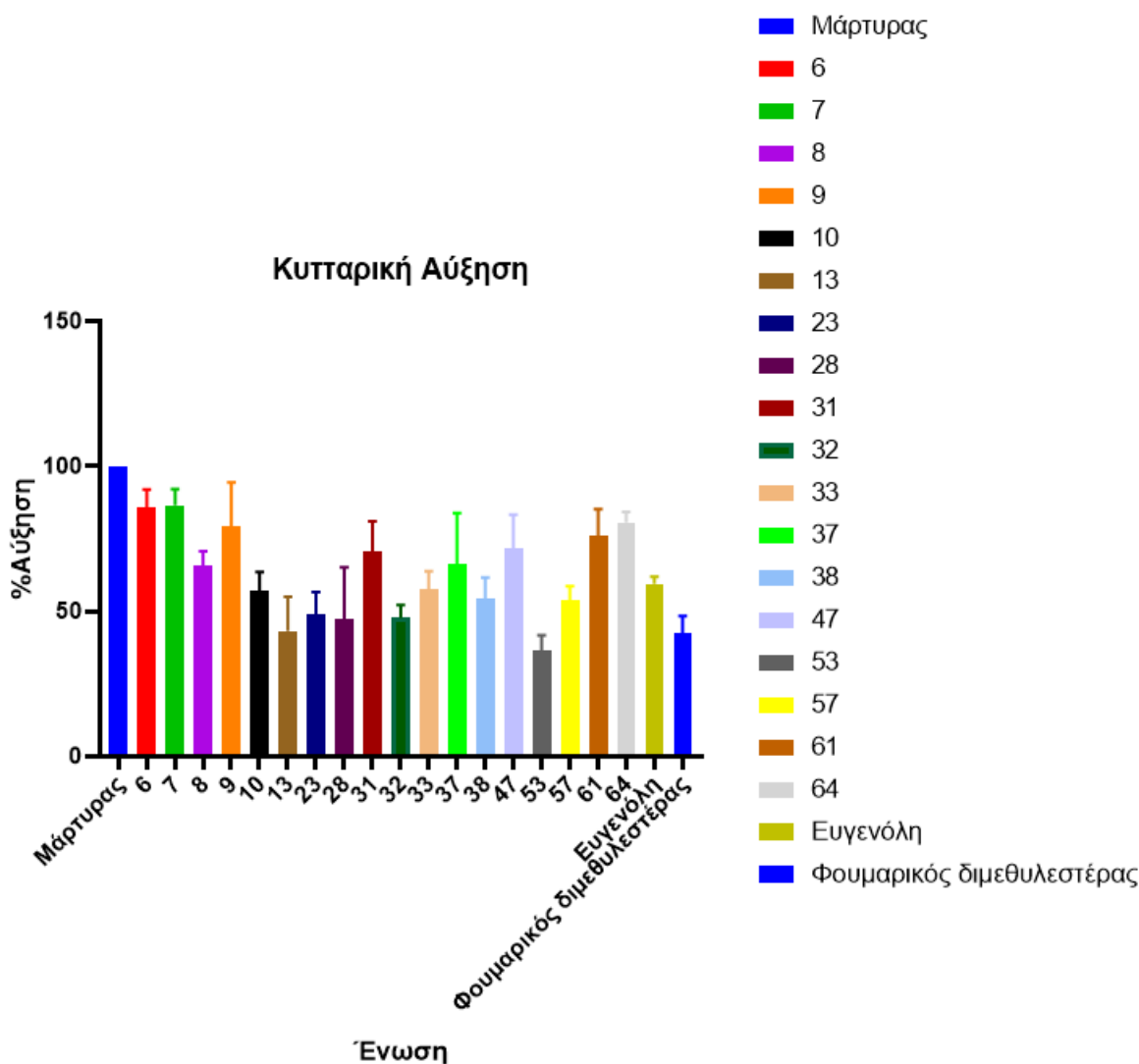
Πίνακας 13: Παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των φυσικών προϊόντων που χρησιμοποιήθηκαν στη δοκιμασία κυτταρικής αύξησης, καθώς και τα αποτελέσματα ως % κυτταρική αύξηση ± SD σε σύγκριση με το μάρτυρα και η % αναστολή ± SD που προκλήθηκε στην αύξηση των κυττάρων από κάθε δείγμα

Για τη δοκιμασία αυτή εφαρμόστηκαν οι ίδιες συνθήκες με τη δοκιμασία κασπάσης. Συγκεκριμένα, τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν σε συγκεντρώσεις όπου αναμένεται μέτρια τοξικότητα στα κύτταρα. Οι όγκοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τέτοιοι ώστε να μην ξεπεραστεί η 0.5% περιεκτικότητα σε DMSO και οι συγκεντρώσεις κάθε ένωσης παρουσιάζονται στον πίνακα 14. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως επί τοις εκατό επιτυχής αύξηση των κυττάρων σε σύγκριση με το μάρτυρα, ο οποίος αντιπροσωπεύει το 100% αλλά και ως επί τοις εκατό αναστολή της αύξησης των κυττάρων (Ιστόγραμμα 9, Ιστόγραμμα 10).

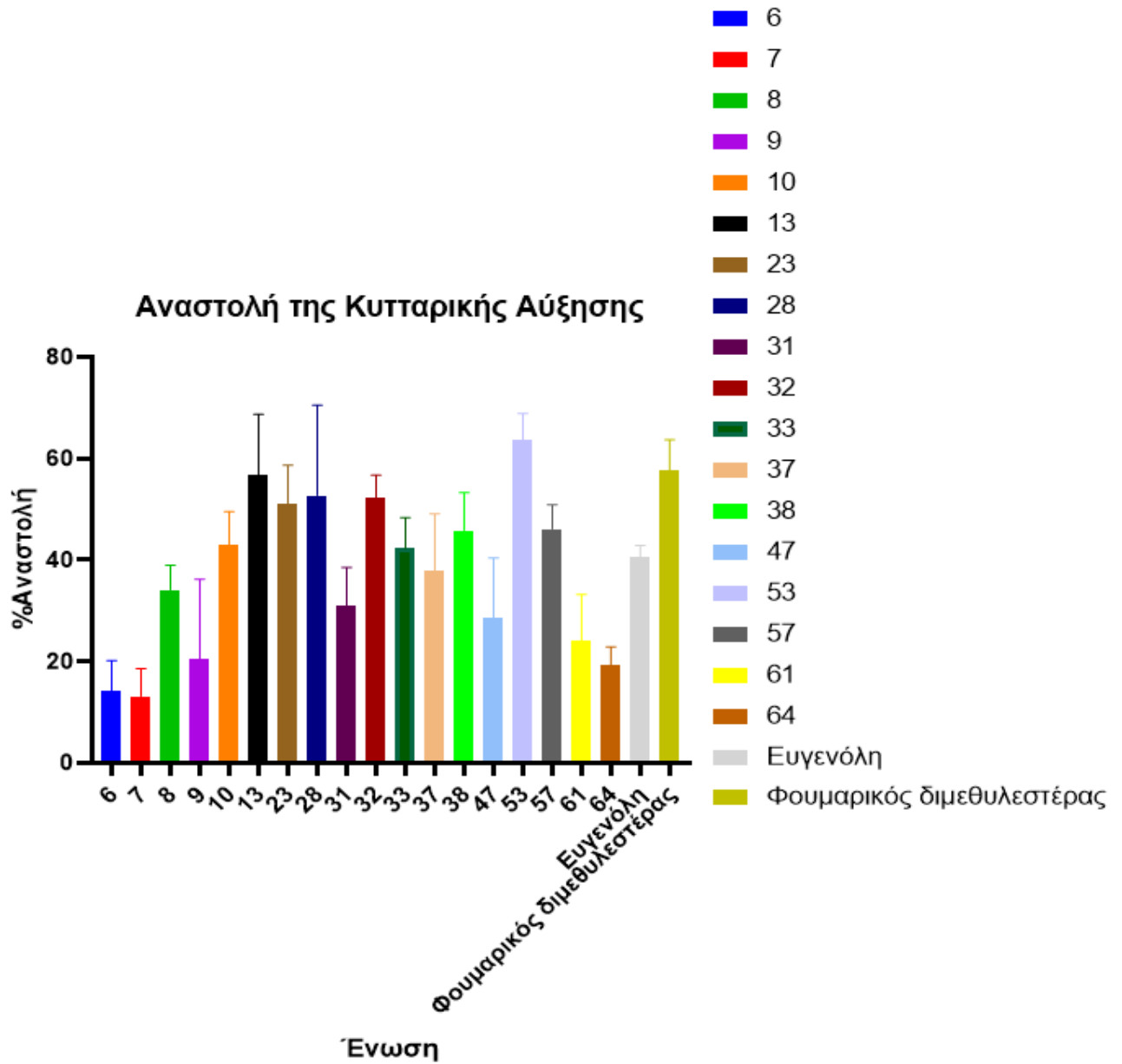
Ένωση	C(μM)	% Αύξηση Κυττάρων	% Αναστολή
6	8.33	85.88 ± 6.11	14.12 ± 6.11
7	8.33	86.49 ± 5.61	13.51 ± 5.6
8	16.67	65.87 ± 4.86	34.13 ± 4.86
9	8.33	79.06 ± 15.38	20.94 ± 15.38
10	16.67	57.03 ± 6.52	42.97 ± 6.52
13	16.67	43.87 ± 11.85	56.83 ± 11.45
23	16.67	48.97 ± 7.63	51.03 ± 7.63
28	16.67	47.3 ± 17.82	52.7 ± 17.82
32	16.67	47.7 ± 4.42	52.3 ± 4.42
33	16.67	57.7 ± 6.07	42.3 ± 6.07
37	16.67	66.07 ± 11.23	33.93 ± 11.23
38	16.67	54.2 ± 7.48	45.8 ± 7.48
47	8.33	71.5 ± 11.85	28.5 ± 11.85
53	8.33	36.45 ± 5.33	63.55 ± 5.33
57	16.67	53.84 ± 4.77	46.16 ± 4.77
61	8.33	75.96 ± 9.16	24.04 ± 9.16
64	8.33	80.66 ± 3.56	19.34 ± 3.56
Ευγενόλη	16.67	59.5 ± 2.38	40.5 ± 2.38

Φουμαρικός Διμεθυλεστερας	16.67	42.36 ± 6.05	57.64 ± 6.05
Μάρτυρας	-	100	0

Πίνακας 14: Αποδίδονται η συγκέντρωση από κάθε ένωση που χρησιμοποιήθηκε για τη δοκιμασία κυτταρικής αύξησης και δραστηριότητας κασπάσης, καθώς και η % κυτταρική αύξηση ± SD που σημειώθηκε με την επώαση των κυττάρων με το κάθε δείγμα, και η % αναστολή ± SD που προκάλεσαν τα δείγματα στις συγκεντρώσεις αυτές.



Ιστόγραμμα 9: Παρουσιάζεται η % κυτταρική αύξηση (σε σύγκριση με το μάρτυρα) μετά από 48h επώασης των κυττάρων με την κάθε ένωση.

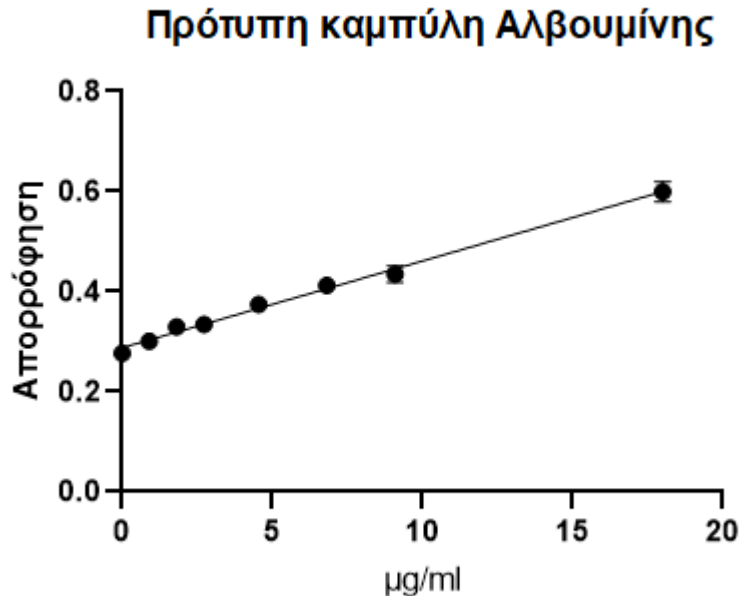


Ιστόγραμμα 10: Παρουσιάζεται η % αναστολή της αύξησης των κυττάρων που προκλήθηκε από την κάθε ένωση στη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε

Για τα αποτελέσματα πραγματοποιήθηκε η One Way ANOVA έδειξε ότι υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ των μέσων της % κυτταρική αύξηση αλλά και μεταξύ των μέσων της % αναστολής ($F(20,41)=10.19, p<0.0001$) και ($F(19,39)=8.852, p<0.0001$) αντίστοιχα. Επιπλέον, η post-hoc πολλαπλή ανάλυση του Dunnett για την % κυτταρική αύξηση απέδειξε ότι όλες οι ενώσεις εκτός από τις 6, 7, 9, 67 έδειξαν στατιστική σημαντική διαφορά στην % κυτταρική αύξηση σε σύγκριση με τον μάρτυρα ($p<0.05$ σε όλες τις υπόλοιπες περιπτώσεις).

3.7 Προσδιορισμός πρωτεϊνικού περιεχομένου

Η δοκιμασία Bradford πραγματοποιήθηκε αρχικά σε διαφορετικές συγκεντρώσεις θετικού μάρτυρα (αλβουμίνη) ώστε να σχηματιστεί η πρότυπη καμπύλη όπως παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 8. Οι τιμές του διαγράμματος αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές από τις 3 επαναλήψεις του πειράματος \pm την τυπική απόκλιση (SD). Βάσει της καμπύλης προσδιορίστηκαν τα περιεχόμενα των δειγμάτων σε πρωτεΐνη.



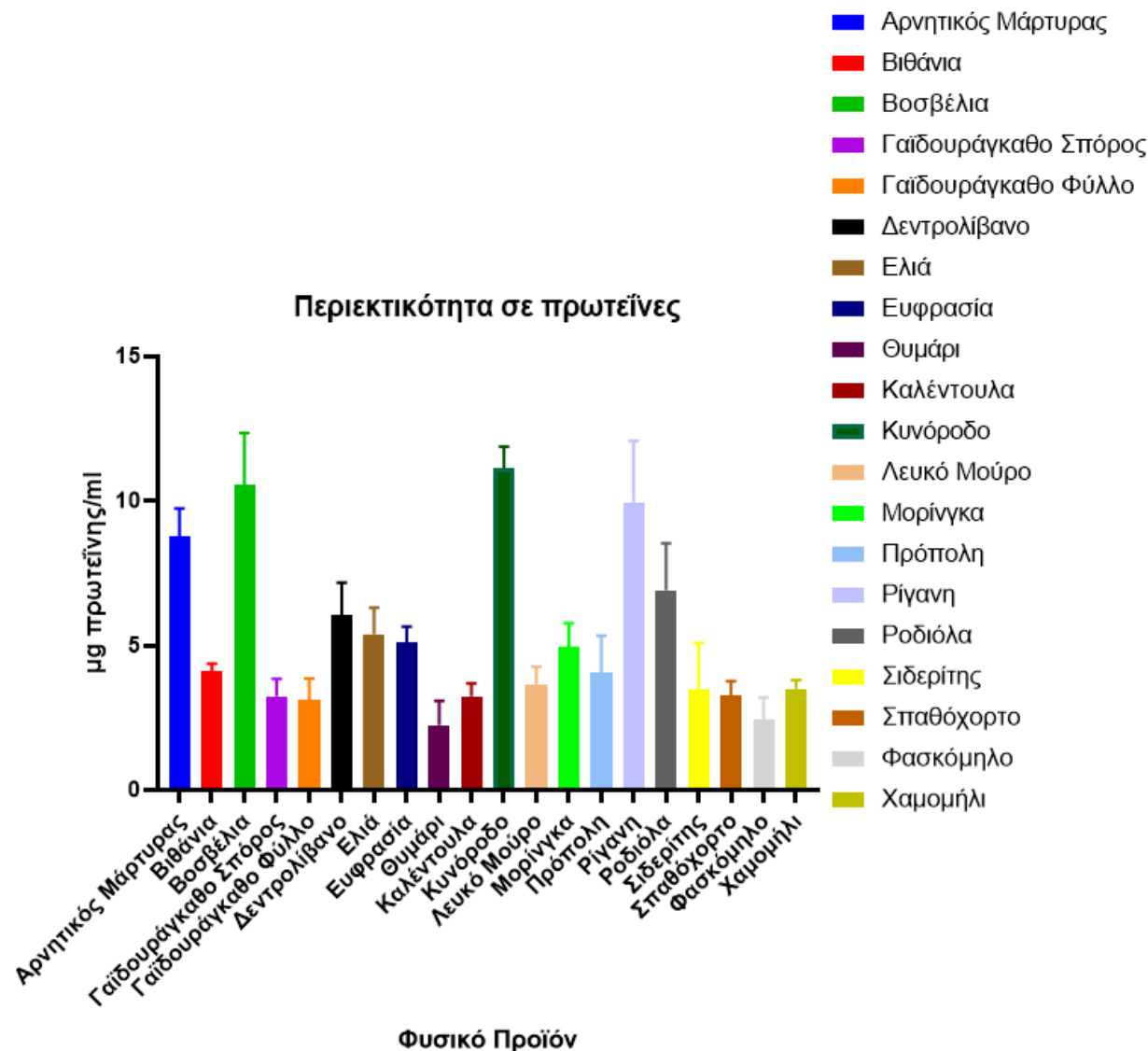
Διάγραμμα 8: Πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης. Οι συγκεντρώσεις αλβουμίνης για τη δημιουργία της καμπύλης ήταν οι (0.9, 1.8, 2.7, 4.5, 6.8, 9, 18 $\mu\text{g/ml}$). Οι τιμές που παρουσιάζονται είναι οι μέσες τιμές \pm SD. Η εξίσωση της ευθείας που προκύπτει από τη γραμμική τάση είναι $Y = 0.01734X + 0.287$, $R^2 = 0.9856$

Με τη δοκιμασία Bradford προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα των διαλυμάτων λυμμένων κυττάρων σε πρωτεΐνες. Ο προσδιορισμός έγινε με την διαλογή των κυτταρικών περιεχομένων μετά από επώαση των κυττάρων με το κάθε δείγμα για 48h.

Πραγματοποιήθηκε One-Way ANOVA με Post hoc ανάλυση Dunnett για σύγκριση των αποτελεσμάτων με τη χρήση δειγμάτων με τα αποτελέσματα του αρνητικού μάρτυρα. Απεδείχθει πως υπάρχει διαφορά μεταξύ των μέσων ($F(19,39)=16.19$) και πως κανένα φυτό δεν παρουσίασε σημαντική αύξηση των πρωτεϊνών στο κυτταρικό διάλυμα. Η ρίγανη, η βοσβέλια, η ροδιόλα και το κυνόροδο εμφάνισαν όμοιες τιμές περιεκτικότητας πρωτεϊνών με τον αρνητικό μάρτυρα. Όλα τα υπόλοιπα φυσικά προϊόντα οδήγησαν σε σημαντική μείωση της συγκέντρωσης πρωτεϊνών ανά ml ($p < 0.05$).

Στα αποτελέσματα συνθετικών ενώσεων έγινε ANOVA με post hoc Dunnett για σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα (όπως και στα φυσικά προϊόντα). Υπήρχε διαφορά μεταξύ των μέσων

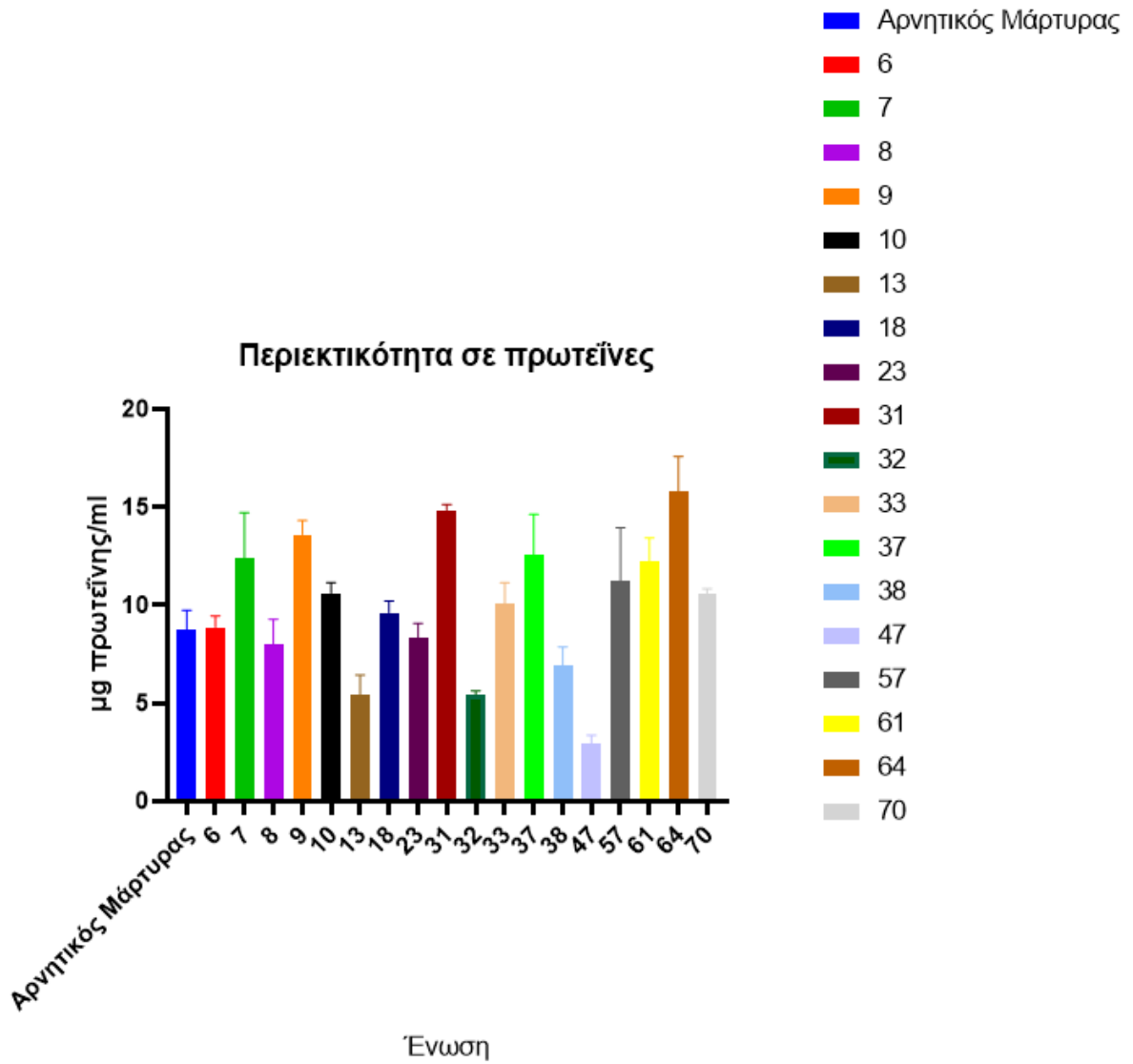
($F(19,39)=16.63$, $p<0.0001$). Από τις ενώσεις, 4 εμφάνισαν αύξηση των πρωτεϊνών. Οι ενώσεις αυτές ήταν η 7 ($p<0.05$), η 9 ($p<0.001$), η 61 ($p<0.0001$) και η 64 ($p<0.05$). Ενώσεις που δεν επηρέασαν σημαντικά την συγκέντρωση πρωτεϊνών στο διάλυμα ήταν η 6, 8, 10, 18, 23, 33, 38, 57 και ο φουμαρικός διμεθυλεστέρας. Ενώσεις που οδήγησαν σε μείωση των πρωτεϊνών ανά ml ήταν οι 13 ($p<0.05$), 37($p<0.05$), 47($p<0.0001$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως, ο μέσος όρος των τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση, συγκεντρωτικά στα Ιστογράμματα 11 και 12 και στους Πίνακες 15 και 16.



Ιστόγραμμα 11: Παρουσιάζεται η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες του εκάστοτε διαλύματος λυμένων κυττάρων μετά από επώαση των κυττάρων με το κάθε δείγμα (φυσικό προϊόν) για 48h. Η στήλη αντιστοιχεί στη μέση τιμή \pm SD

Δείγμα	μg πρωτεΐνης/ml
Αρνητικός μάρτυρας	8.77 ± 0.97
Βιθάνια	4.10 ± 0.26
Βοσβέλια	10.55 ± 1.79
Γαϊδουράγκαθο Σπόρος	3.24 ± 0.6
Γαϊδουράγκαθο Φύλλο	3.1 ± 0.76
Δεντρολίβανο	6.06 ± 1.12
Ελιά	5.3 ± 0.918
Ευφρασία	5.11 ± 0.54
Θυμάρι	2.25 ± 0.83
Καλέντουλα	3.25 ± 0.44
Κυνόροδο	11.13 ± 0.74
Λευκό Μούρο	3.66 ± 0.6
Μορίγγκα	4.94 ± 0.84
Πρόπολη	4.07 ± 1.26
Ρίγανη	9.95 ± 2.12
Ροδιόλα	6.90 ± 1.63
Σιδερίτης	3.51 ± 1.58
Σπαθόχορτο	3.28 ± 0.48
Φασκόμηλο	2.44 ± 0.76
Χαμομήλι	3.51 ± 0.3

Πίνακας 15: Παρουσιάζονται οι μέσες τιμές περιεκτικότητας πρωτεϊνών των λυμμένων κυττάρων μετά από επώασή τους με τα δείγματα για 48h ± SD



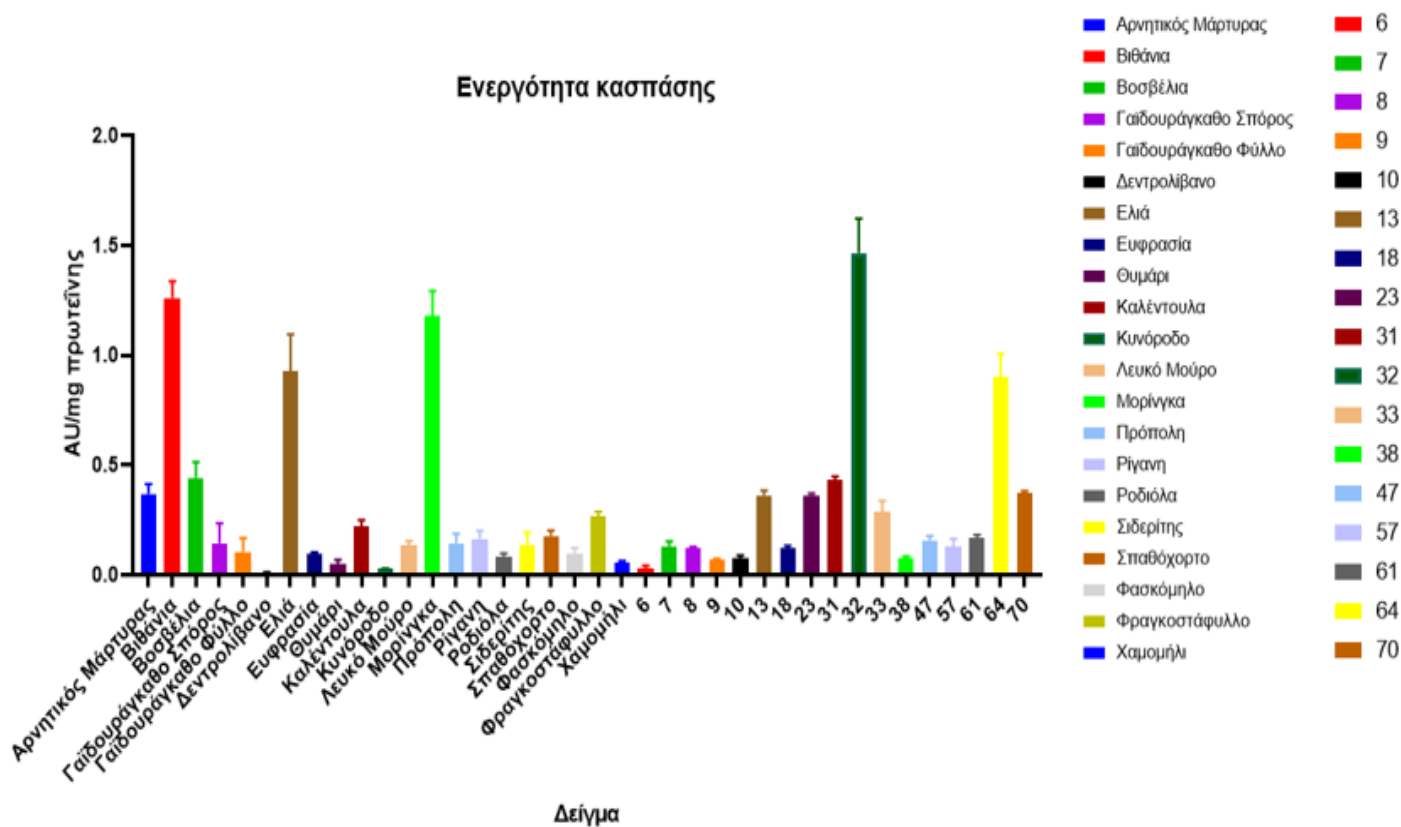
Ιστόγραμμα 12 Παρουσιάζεται η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες του εκάστοτε διαλύματος λυμμένων κυττάρων μετά από επώαση των κυττάρων με το κάθε δείγμα (ένωση) για 48h. Η στήλη αντιστοιχεί στη μέση τιμή ± SD

Δείγμα	μg πρωτεΐνης/ml
Αρνητικός μάρτυρας	8.77 ± 0.97
6	8.88 ± 0.58
7	12.38 ± 2.34
8	8.01 ± 1.28
9	13.60 ± 0.72
10	10.61 ± 0.54
13	5.41 ± 1.02
18	9.62 ± 0.59
23	8.32 ± 0.76
32	5.45 ± 0.19
33	10.08 ± 1.06
38	6.89 ± 0.98
47	2.96 ± 0.41
57	11.25 ± 2.70
61	12.26 ± 1.17
64	15.80 ± 1.78
Φουμαρικός Διμεθυλεστέρας	10.58 ± 0.26

Πίνακας 16: Παρουσιάζονται οι μέσες τιμές περιεκτικότητας πρωτεϊνών των λυμμένων κυττάρων μετά από επώασή τους με τα δείγματα για 48h ± SD

3.8 Προσδιορισμός ενεργότητας Κασπάσης

Ο προσδιορισμός της ενεργής κασπάσης στα δείγματα πραγματοποιήθηκε μετά από επώαση των κυττάρων με το κάθε δείγμα για 24h και τα αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίνακα 17. Υπήρχαν δείγματα που προκάλεσαν αυξημένη ενεργότητα κασπάσης σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα (κύτταρα χωρίς δείγμα), όπως ήταν οι ενώσεις 32, 64 και τα εκχυλίσματα βιθάνιας, ελιάς και μορίγκαας. Υπήρχαν δείγματα που δεν επηρέασαν την ενεργότητα της κασπάσης σημαντικά. Αρκετά δείγματα οδήγησαν σε μείωση της ενεργότητας της κασπάσης (όπως ήταν η ένωση 6, 38, τα εκχυλίσματα γαϊδουράγκαθου και χαμομηλιού).



Ιστόγραμμα 13: Η ενεργότητα κασπάσης στα κύτταρα, εκφρασμένη ως μονάδες απορρόφησης ανά mg πρωτεΐνης, μετά από επώαση για 48h με το κάθε δείγμα.

Δείγμα	Ενεργή Κασπάση / (μg πρωτεΐνης/ml)
Αρνητικός μάρτυρας	0.37 ± 0.04
6	0.03 ± 0.01
7	0.13 ± 0.02
8	0.12 ± 0.01
9	0.07 ± 0.00
10	0.07 ± 0.02
13	0.36 ± 0.02
18	0.12 ± 0.01
23	0.36 ± 0.01
32	1.46 ± 0.16
33	0.29 ± 0.05
38	0.07 ± 0.01

47	0.16 ± 0.02
57	0.13 ± 0.04
61	0.17 ± 0.02
64	0.90 ± 0.1
70	0.37 ± 0.01
Βιθάνια	1.26 ± 0.08
Βοσβέλια	0.44 ± 0.07
Γαϊδουράγκαθο Σπόρος	0.14 ± 0.09
Γαϊδουράγκαθο Φύλλο	0.10 ± 0.06
Δεντρολίβανο	0.01 ± 0.00
Ελιά	0.93 ± 0.16
Ευφρασία	0.09 ± 0.01
Θυμάρι	0.05 ± 0.02
Καλέντουλα	0.22 ± 0.03
Κυνόροδο	0.03 ± 0.00
Λευκό Μούρο	0.13 ± 0.02
Μορίνγκα	1.18 ± 0.114
Πρόπολη	0.14 ± 0.04
Ρίγανη	0.16 ± 0.04
Ροδιόλα	0.08 ± 0.02
Σιδερίτης	0.14 ± 0.06
Σπαθόχορτο	0.18 ± 0.02
Φασκόμηλο	0.10 ± 0.03
Φραγκοστάφυλλο	0.27 ± 0.02
Χαμομήλι	0.06 ± 0.00

Πίνακας 17: Ενεργή κασπάση των κυττάρων ανά περιεκτικότητα των κυττάρικόν διαλυμάτων σε πρωτεΐνες.

Στα αποτελέσματα της ενεργής κασπάσης των κυττάρων πραγματοποιήθηκε One-Way Anova και Post hoc ανάλυση του Dunnett, για σύγκριση των αποτελεσμάτων κάθε δοκιμής με τα αποτελέσματα του μάρτυρα. Η Anova απέδειξε πως υπάρχει διαφορά μεταξύ των μέσων ($F(37.74)=123.2$, $p<0.0001$). Η πολλαπλή σύγκριση του Dunnett απέδειξε πως τα περισσότερα δείγματα (ενώσεις και φυσικά εκχυλίσματα) προκάλεσαν αλλαγή στην ενεργή κασπάση στα κύτταρα ($p<0.05$, σε όλες τις περιπτώσεις). Εξαιρέσεις (που δεν προκάλεσαν σημαντική αλλαγή στην ενεργή κασπάση) αποτελούν τα εκχυλίσματα της βοσβέλιας, και του φραγκοστάφυλλου και οι ενώσεις 13, 23, 33, 70.

3.9 RT-qPCR

Η RT-qPCR έδειξε την έκφραση των γονιδίων *AKTB*, *GCLC*, *HO-1*, *NQO1*. Η έκφραση του εκάστοτε γονιδίου μετατράπηκε σε λόγο της του γονιδίου προς την έκφραση του γονιδίου μάρτυρα (*AKTB*). Έπειτα έγινε σύγκριση των λόγων των εκφράσεων, διαιρώντας τον λόγο έκφρασης που προκύπτει από τα κύτταρα που επωάστηκαν με το δείγμα προς τον λόγο έκφρασης που προκύπτει από τα κύτταρα στα οποία δεν χορηγήθηκε κανένα δείγμα.

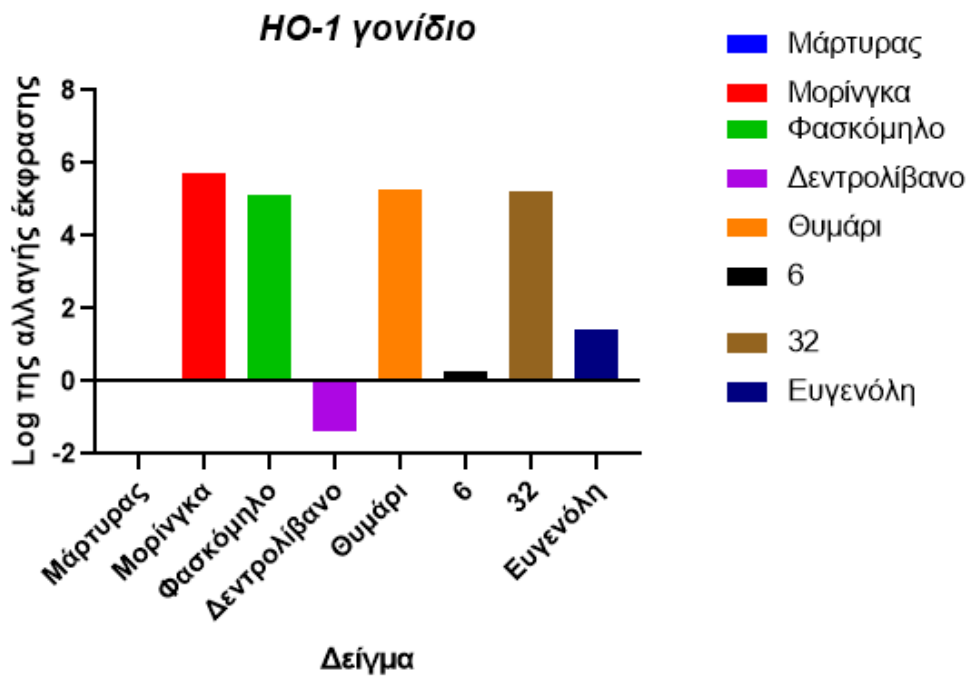
Οι PCR πραγματοποιήθηκαν για 60 κύκλους. Τα κύτταρα που δοκιμάστηκαν ήταν: κύτταρα χωρίς χορήγηση κάποιας ουσίας, κύτταρα μετά από χορήγηση της ένωσης 6, κύτταρα με την ένωση 32 και κύτταρα με την ευγενόλη. Επίσης δοκιμάστηκε η επίδραση της μορίνγκας, του φασκόμηλου, του δεντρολίβανου και του θυμαριού στην έκφραση των γονιδίων. Τα γονίδια εμφανίστηκαν πριν από τους 40 κύκλους σε κάθε περίπτωση με εξαίρεση το γονίδιο *NQO1* μετά τη χορήγηση του εκχυλίσματος δεντρολίβανου, το οποίο έδωσε crossing point - CP=58.1. Όλα τα δείγματα που δοκιμάστηκαν έδειξαν να αυξάνουν την έκφραση των γονιδίων στόχων του Nrf2, με εξαίρεση το εκχύλισμα του δεντρολίβανου, το οποίο μείωσε την έκφραση *HO-1* και *NQO1*, αλλά αύξησε την έκφραση του *GCLC*. Οι λόγοι έκφρασης των ρυθμιζόμενων γονιδίων με το γονίδιο μάρτυρα και οι λόγοι σύγκρισης με τα κύτταρα μάρτυρες εμφανίζονται στον Πίνακα 18.

Δείγμα	Γονίδια	Συγκριτικά με το γονίδιο ακτίνης	Σύγκριτικά με την έκφραση του γονιδίου στα κύτταρα-μάρτυρες
Ένωση 6	<i>GCLC</i>	0.18	86.22
	<i>HO-1</i>	2.0188E-07	0.07
	<i>NQO1</i>	0.002	23.26
Ένωση 32	<i>GCLC</i>	0.3	3821.70
	<i>HO-1</i>	0.05	164759.26
	<i>NQO1</i>	0.04	4803.93
Ευγενόλη	<i>GCLC</i>	0.23	109.9
	<i>HO-1</i>	8.63167E-05	28.05
	<i>NQO1</i>	0.01	95.67

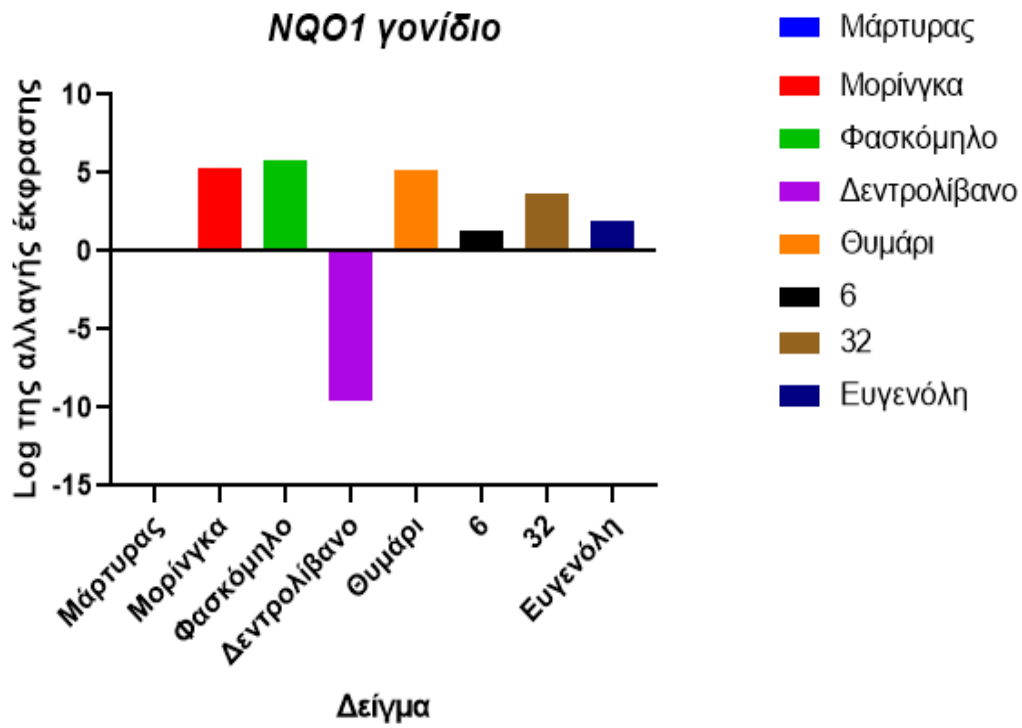
<i>Μορίνγκα</i>	<i>HO-1</i>	0.18	539027.74
	<i>NQOI</i>	1.61	187951.38
<i>Φασκόμηλο</i>	<i>HO-1</i>	0.04	134756.93
	<i>NQOI</i>	5.1	593957.42
<i>Δεντρολίβανο</i>	<i>GCLC</i>	0.14	1820.35
	<i>HO-1</i>	1.36171E-08	0.04
	<i>NQOI</i>	2.46045E-15	2.86648E-10
<i>Θυμάρι</i>	<i>GCLC</i>	6.77	87076.75
	<i>HO-1</i>	0.06	194579.47
	<i>NQOI</i>	1.36	158047.64

Πίνακας 18: Έκφραση γονιδίων στα κύτταρα K562 μετά τη χορήγηση ορισμένων δειγμάτων.

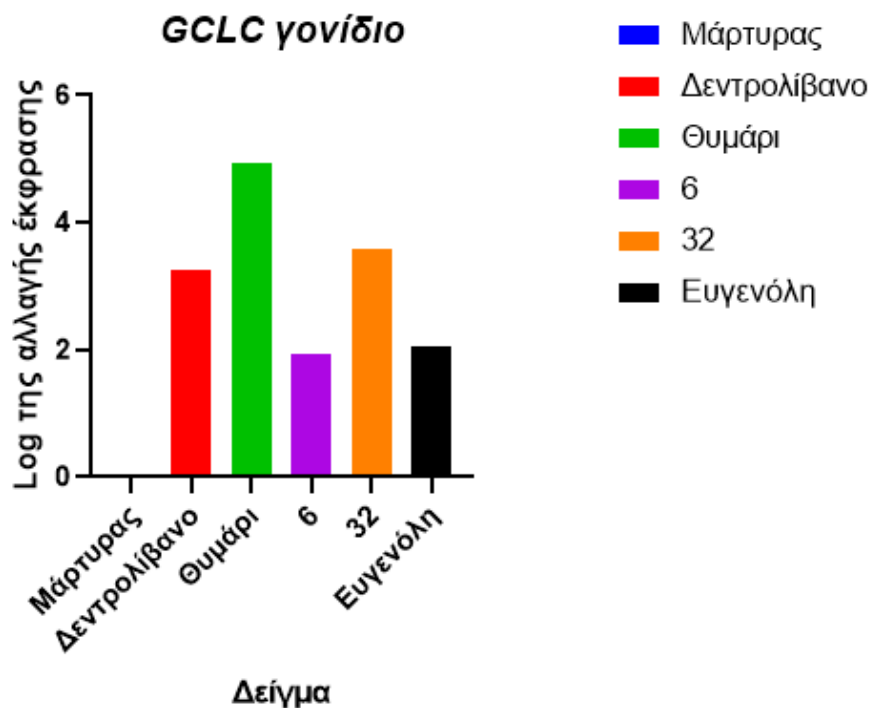
Τα αποτελέσματα της αλλαγής έκφρασης των γονιδίων σε σύγκριση με το μάρτυρα, εμφανίζονται λογαριθμημένα στα ιστογράμματα 14, 15 και 16.



Ιστόγραμμα 14: Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αλλαγής έκφρασης HO-1 μετά από κάθε δοκιμή σε σύγκριση με την έκφραση του γονιδίου στον μάρτυρα. Η έκφραση του γονιδίου μειώθηκε με τη χορήγηση εκχυλίσματος δεντρολίβανου. Τα υπόλοιπα δείγματα αύξησαν την έκφραση



Ιστόγραμμα 15: Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αλλαγής έκφρασης NQO1, μετά από κάθε δοκιμή σε σύγκριση με την έκφραση του γονιδίου στον μάρτυρα. Η έκφραση του γονιδίου μειώθηκε με τη χορήγηση δεντρολίβανου, ενώ αυξήθηκε σε όλες τις άλλες περιπτώσεις.



Ιστόγραμμα 16: Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αλλαγής έκφρασης GCLC μετά από κάθε δοκιμή σε σύγκριση με την έκφραση του γονιδίου στον μάρτυρα. Η έκφραση του γονιδίου αυξήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις.

Συζήτηση

1. Αντιοξειδωτική δράση των φυτικών εκχυλισμάτων και χημικών ενώσεων

Η περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε φαινολικές ουσίες εξαρτάται από το διαλύτη εκχύλισης που χρησιμοποιείται, από το χρόνο εκχύλισης, από τη θερμοκρασία εκχύλισης¹¹³, από τα μέρη του φυτού που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση αλλά και από παράγοντες που έχουν να κάνουν με το ίδιο το φυτό¹¹⁴. Τέτοιοι παράγοντες είναι η ηλικία του φυτού¹¹⁴, η τοποθεσία από όπου συλλέχθηκε το φυτό ή το φυσικό προϊόν (στην περίπτωση της πρόπολης), το λίπασμα που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη του φυτού, οι συνθήκες του περιβάλλοντος που αναπτύχθηκε⁷¹. Το TPC εμφανίζει μια ανάλογη σχέση με την αντιοξειδωτική ικανότητα του προϊόντος^{115,116}. Έτσι, διαφορετικές ικανότητες αντιοξειδωτικής δράσης αναμένονται σε διαφορετικά εκχυλίσματα των ίδιων φυτών⁶⁵. Τα φυσικά εκχυλίσματα με το πλουσιότερο περιεχόμενο σε φαινολικές ουσίες ήταν του θυμαριού και της ροδιόλας, τα οποία και εμφάνισαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Επίσης υψηλά σε φαινολικές ουσίες ήταν και άλλα φυτά (φασκόμηλο, σιδερίτης, ρίγανη, δεντρολίβανο), όπως έχει ήδη αναφερθεί⁷⁶, με τη διαφορά ότι εδώ

την υψηλότερη περιεκτικότητα την εμφάνισε το θυμάρι, ενώ στην εργασία εκείνη προσδιορίστηκε στο φασκόμηλο. Η πρόπολη και το φραγκοστάφυλο εμφάνισαν TPC όμοιο με αυτό που αναφέρεται από τη βιβλιογραφία^{79,117}. Τα προϊόντα που εμφάνισαν εξαιρετικά χαμηλό TPC ήταν η βιθάνια, η ευφρασία, το λευκό μούρο και η βοσβέλια, με τη βοσβέλια να εμφανίζει μηδενικό–μη ανιχνεύσιμο TPC. Τα αποτελέσματα της βιθάνιας έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των *Munir* και συν., οι οποίοι προσδιόρισαν το TPC της βιθάνιας σε 372.81 ± 7.71 mg GAE/g¹¹⁸. Το TPC του λευκού μούρου ήταν όμοιο με αυτό που αναφέρεται στη βιβλιογραφία σε υδρομεθανολικά εκχυλίσματα του φυτού¹¹³. Η βοσβέλια σε διάφορα εκχυλίσματα έχει προσδιοριστεί ως φτωχή σε πολυφαινόλες, με σχετικά χαμηλή αντιοξειδωτική δράση, χωρίς όμως αυτό να αναιρεί τις ιδιότητές της¹¹⁹. Η βοσβέλια στα πειράματα μας εμφάνισε μηδαμινό περιεχόμενο σε φαινόλες και μη ανιχνεύσιμη αντιοξειδωτική δράση, παρόλα αυτά είχε επίδραση στην αύξηση των κυττάρων.

Σε συμφωνία με το συνολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ουσίες ήρθαν και τα πειράματα αντιοξειδωτικής δράσης, καθώς η ροδιόλα και το θυμάρι (τα πλουσιότερα σε TPC) είχαν και τη μέγιστη αντιοξειδωτική δράση. Το εκχύλισμα ροδιόλας εμφάνισε τη μικρότερη $IC_{50} = 0.015 \pm 0.001$ mg/ml, στη δοκιμασία εξουδετέρωσης της ρίζας του ABTS, ενώ το εκχύλισμα θυμαριού είχε τη μικρότερη $IC_{50} = 0.079 \pm 0.006$ mg/ml, στη δοκιμασία εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH. Η ροδιόλα στη δοκιμή ABTS εκφρασμένη σε ισοδύναμα $\mu\text{mol Trolox/g}$ εμφανίζει διαφορές από την εργασία των *Kosakowska* και συν.⁶⁵. Στην εργασία αυτή προσδιορίζονται 45.8 ± 1.1 $\mu\text{mol Trolox/g}$ ροδιόλας σε αιθανολικό εκχύλισμα, ενώ στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκε 1698.34 ± 83.87 $\mu\text{mol Trolox/g}$ ροδιόλας. Οι διαφορές αυτές είναι πιθανό να οφείλονται στους παράγοντες που αναφέρθηκαν πιο πάνω. Η IC_{50} που προσδιορίστηκε για την αναστολή του DPPH από το αιθανολικό εκχύλισμα θυμαριού είναι παρόμοια με αυτήν που προσδιορίστηκε από το *T. vulgaris* μετά από υδατική εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα ($IC_{50} = 0.094 \pm 0.013$ mg/ml)¹²⁰. Μέτρια προς υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα εμφάνισαν επίσης το φασκόμηλο, το φραγκοστάφυλλο, η πρόπολη, η ρίγανη και το δεντρολίβανο, το οποίο συμφωνεί με τα TPC των φυτών. Ο σιδηρίτης αν και είχε υψηλό TPC είχε μέτρια προς χαμηλή ικανότητα εξουδετέρωσης της ABTS•, και της DPPH•, αυτό πιθανώς οφείλεται στη φύση των φαινολικών ουσιών που βρίσκονται στο εκχύλισμα. Παρατηρήθηκε μία ισχυρή αρνητική συσχέτιση του TPC με την ικανότητα εξουδετέρωσης των ριζών του ABTS και της DPPH. Μετά από έλεγχο της μονοτονικότητας και της κανονικότητας των δεδομένων πραγματοποιήθηκε Pearson τεστ και απεδείχθη η συσχέτιση του TPC και των ABTS και DPPH. Συγκεκριμένα, το TPC συσχετίζεται αρνητικά με τον προσδιορισμό της IC_{50} για την εξουδετέρωση της DPPH• ($r=-0.663$, $p<0.01$) και τον προσδιορισμό IC_{50} εξουδετέρωσης της ABTS• ($r=-0.691$, $p<0.01$), ενώ υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ του προσδιορισμού της IC_{50} για την εξουδετέρωση της DPPH• και IC_{50} για την ABTS• ($r=0.903$, $p<0.01$). Έτσι, υψηλότερη TPC συσχετίζεται με μεγαλύτερη ικανότητα εξουδετέρωσης των ριζών, όπως αναφέρεται και στο άρθρο¹²¹. Επίσης, προσδιορίστηκε πως η ικανότητα εξουδετέρωσης της μίας ρίζας συσχετίζεται με την ικανότητα εξουδετέρωσης της άλλης ρίζας, παρατήρηση που έρχεται σε συμφωνία με τους *Floegel* και συν.¹²². Παρά τη συσχέτιση που παρατηρήθηκε οι δύο μέθοδοι εμφανίζουν διαφορές, καθώς η μέθοδος εξουδετέρωσης ABTS

εντοπίζει λιποδιαλυτές και υδατοδιαλυτές αντιοξειδωτικές ενώσεις, ενώ στη μέθοδο DPPH λόγω του διαλύτη που χρησιμοποιείται, η ρίζα εξουδετερώνεται από υδρόφοβες ενώσεις¹²².

Από τις συνθετικές ενώσεις δεν βρέθηκε καμία με πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση από τους θετικούς μάρτυρες (καφεϊκό οξύ και ευγενόλη). Ωστόσο, οι ενώσεις 6, 32 και 58 έδειξαν υψηλή αντιοξειδωτική δράση και στις δύο δοκιμές (εξουδετέρωσης των ριζών ABTS• και DPPH•). Από αυτές η 6 και η 32 είναι παράγωγα β-ιονόνης. Το κοινό τους στοιχείο είναι η π-υδροξυλομάδα στον δακτύλιο, η οποία σε συνδυασμό με την παρουσία μ-οξυγόνου είναι πιθανό να ενισχύει την αντιοξειδωτική δράση, καθώς και η ένωση 34 παρουσίασε ικανότητα εξουδετέρωσης του ABTS•, ενώ η ένωση 29 με υδροξύλια στις θέσεις όρθο- και μέτα- δεν είχε δράση σε καμία από τις δύο ρίζες. Η ένωση 41 με μόνο ένα υδροξύλιο στη θέση όρθο- ανέδειξε πολύ μικρή αναστολή της ρίζας DPPH•. Η ένωση 44, η οποία έδειξε υψηλή δραστηριότητα στην εξουδετέρωση της ABTS•, ήταν η πιο δραστική χαλκόνη και έχει στον ένα δακτύλιο (R1) μία μεθοξομάδα σε μ- θέση και ένα π-υδροξύλιο και στον άλλον δακτύλιο (R2) εμφανίζει π- και μ-μεθοξομάδα. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με τα ευρήματα των Bale και συν., οι οποίοι αναφέρουν πως η παρουσία π-μεθοξομάδας στον R1 και διαφόρων υποκαταστατών στον R2 ευνοεί την αντιοξειδωτική δράση των χαλκονών¹²³. Υπήρχαν αρκετές ενώσεις που ενώ εξουδετέρωσαν την ρίζα του DPPH αδυνατούσαν να εξουδετερώσουν την ABTS•, γεγονός το οποίο μπορεί να οφείλεται στη φύση της ουσίας, τη διαλυτότητά της και στο μηχανισμό δράσης¹²¹. Οι ενώσεις με τη μεγαλύτερη σταθερά αντίδρασης με κυστεΐνη/κυστεαμίνη ήταν χαλκόνες (ένωση 1) και παράγωγα χαλκονών (ενώσεις 2, 7, 8 – χαλκόνες με τριφθοροομάδα στον δακτύλιο) καθώς και ενώσεις με δυνατότητα αντίδρασης 1,4 συζυγούς προσθήκης (διχαλκόνες – ενώσεις 14 και 15) με μία τριφθορομεθυλο ομάδα στο δακτύλιο. Μία πιθανή αιτιολόγηση είναι πως η τριφθορομέθυλο ομάδα έχει ισχυρή ηλεκτρονιοελκτική ιδιότητα με αποτέλεσμα να εξασθενεί το διπλό δεσμό και ευνοεί την προσθήκη Michael με την κυστεΐνη¹²⁴. Ωστόσο, ο συντονισμός των ηλεκτρονίων δεν είναι το μοναδικό κριτήριο επιτυχίας της αντίδρασης¹²⁴.

Η διαφοροποίηση του σχήματος των κυττάρων, η οποία εμφανίστηκε μετά από επώαση με διάφορα δείγματα και εντονότερα παρουσιάστηκε με επώαση με τη βιθάνια, θα μπορούσε να οφείλεται στην έκφραση ορισμένων γονιδίων. Οι Wang και συν., παρουσίασαν παρόμοιες μορφές των κυττάρων K562, οι οποίες φαίνεται να οφείλονται σε διαφορετική έκφραση ινωδονεκτίνης και έτσι σε διαφορετική ικανότητα κυτταρικής συγκόλλησης¹²⁵.

2. Επίδραση των φυτικών εκχυλισμάτων και χημικών ενώσεων στον πολλαπλασιασμό και στην απόπτωση των κυττάρων K562

Η ενεργότητα της κασπάσης-3 σχετίζεται με τη διαδικασία της κυτταρικής απόπτωσης¹²⁶. Οι κασπάσες είναι πιθανό να συμμετέχουν και σε κάποιες νεκρωτικές διαδικασίες όπως πυρρόπτωση και νεκρόπτωση, για παράδειγμα η κασπάση 8 αναστέλλει τη διαδικασία της νεκρόπτωσης και διάφορες κασπάσες, ανάλογα το εναρκτήριο σήμα, συμμετέχουν στην πυρρόπτωση^{127,128}. Άλλες νεκρωτικές διεργασίες του κυττάρου όπως η φερρόπτωση και ο παρθάνατος (parthanatos) είναι ανεξάρτητες από κασπάσες¹²⁸. Η σχετική μείωση του κυτταρικού πληθυσμού με τη χορήγηση

ένωσης ή εκχυλίσματος μπορεί να οφείλεται είτε στη νέκρωση ή απόπτωση των κυττάρων ή και την αναστολή του πολλαπλασιασμού τους. Για παράδειγμα εκχύλισμα από *R. rosea*, το οποίο περιέχει σαλιδροσίδη, έχει αποδειχθεί πως εμποδίζει την αύξηση των εμβρυικών ινοβλαστών ποντικού με μεταλλαγμένο p53¹²⁹. Η *Rhodiola imbricate* αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό κυττάρων K562¹³⁰ (τα οποία έχουν μεταλλαγμένη μορφή p53¹³¹). Επιπλέον, η σαλιδροσίδη (συστατικό της *R. rosea*) εμποδίζει την ενεργοποίηση μερικών κασπασών, μεταξύ των οποίων βρίσκεται και η κασπάση-3¹³⁰. Τα αποτελέσματα των συγκεκριμένων πειραμάτων για τη *R. rosea* συμφωνούν με τα ευρήματα που παρουσιάστηκαν ανωτέρω. Η *R. rosea* προκάλεσε αναστολή της αύξησης του πληθυσμού των κυττάρων K562, ενώ παράλληλα μειώθηκε η ενεργότητα κασπάσης σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα. Επομένως, μπορεί να υπάρχει αναστολή της αύξησης του κυτταρικού πληθυσμού χωρίς να εμφανίζεται αυξημένη θανάτωση των κυττάρων όπως παρατηρήθηκε σε περιπτώσεις στις παραγράφους 3.5 και 3.6. Αποτελέσματα μείωσης των κυττάρων με παράλληλη αναστολή της ενεργότητας της κασπάσης μπορούν να εξηγηθούν από όσα αναφερθήκαν. Από την άλλη, μείωση του πληθυσμού των κυττάρων με αύξηση της ενεργότητας της κασπάσης-3 είναι επίσης εύλογη, καθώς φαίνεται να σχετίζεται με το αποπτωτικό μονοπάτι των κυττάρων. Η *M. oleifera* έδειξε μείωση του πληθυσμού του κυττάρου με αυξημένη ενεργότητα της κασπάσης-3. Μεθανολικό εκχύλισμα *M. oleifera* εμφανίζει κυτταροτοξική δράση σε κύτταρα καρκίνου του προστάτη (PC-3), προκαλεί υπάρχει αύξηση της απόπτωσης και αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο¹³². Οι Diab και συν. πρότειναν πως η *M. oleifera* έχει κυτταροστατική δράση στα K562, ενώ δεν εντόπισαν αποπτωτική δράση¹³³, κάτι που φαίνεται να έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματά μας όπου εμφανίστηκε αύξηση της ενεργότητας της κασπάσης-3. Η *W. somnifera* προκάλεσε αύξηση της ενεργότητας της κασπάσης και μείωση του κυτταρικού πληθυσμού. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με υπάρχοντα δεδομένα που ορίζουν τη βιθάνια ως κυτταροτοξική ενάντια σε καρκινικά κύτταρα και μάλιστα η βιθανολίδη D προκαλεί απόπτωση αλλά και αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα K562^{134,135}. Το δεντρολίβανο, το φασκόμηλο και το πράσινο τσάι έχουν παρουσιάσει κυτταροστατικές ιδιότητες όταν χορηγούνται σε K562¹³⁶. Το τερπινολένιο (περιέχεται στο δεντρολίβανο και στο φασκόμηλο) προκαλεί απόπτωση των K562¹³⁶. Στο δεντρολίβανο δεν φαίνεται να υποστηρίζεται αποπτωτική επίδραση στα K562 από τα αποτελέσματά μας. Ωστόσο, τα εκχυλίσματα δεντρολίβανου, φασκόμηλου και πράσινου τσαγιού εμφάνισαν μείωση του πληθυσμού των κυττάρων K562 με μειωμένη ενεργότητα κασπάσης, κάτι που θα μπορούσε να οφείλεται στην κυτταροστατική τους δράση. Το *T. vulgaris* εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των K562 και προκαλεί διαφοροποίηση των κυττάρων¹³⁷. Έχουν προσδιοριστεί και άλλα είδη του γένους *Thymus*, τα οποία αυξάνουν τον κυτταρικό θάνατο των K562, όπως το *T. lanceolatus*¹³⁸. Τα αποτελέσματα του θυμαριού στα πειράματα έδειξαν ότι ενώ αναστέλλεται η αύξηση του πληθυσμού, δεν αυξάνεται η ενεργή κασπάση-3. Η κυτταροτοξική δράση της *B. sacra* στα K562 έχει ήδη σημειωθεί με $IC_{50}=13.7\mu\text{g/ml}$ ¹³⁹. Στην εργασία αυτή εντοπίστηκε αναστολή της αύξησης του πληθυσμού K562 χωρίς στατιστικά σημαντική αύξηση της κασπάσης-3. Το εκχύλισμα του γαϊδουράγκαθου «σιλυμαρίν» έχει αντι-πολλαπλασιαστικές ιδιότητες στα K562¹⁴⁰, το οποίο θα μπορούσε να εξηγήσει τη μείωση των κυττάρων που παρατηρήθηκε. Επιπλέον έχει σημειωθεί να αυξάνει την

απόπτωση των κυττάρων K562¹⁴⁰, κάτι που φαίνεται να έρχεται σε αντίθεση με τη μείωση της ενεργότητας της κασπάσης-3 συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα, ωστόσο αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στη διαφορετική σύσταση των εκχυλισμάτων. Τα φύλλα ελιάς (της ποικιλίας Chemlali) έχουν χρησιμοποιηθεί σε πειράματα με κύτταρα K562 και έχουν επάγει την διαφοροποίηση των κυττάρων και την απόπτωσή τους¹⁴¹. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε περισσότερο από 3 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση (560 µg/ml) από ότι χρησιμοποιήσαν οι Samet και συν. (150 µg/ml)¹⁴¹. Σημειώθηκε σημαντική αναστολή της αύξησης του αριθμού των κυττάρων από τα φύλλα ελιάς και αύξηση της ενεργότητας κασπάσης-3. Η ευφρασία, όπως και το χαμομήλι, είναι ένα ασθενές αντικαρκινικό ενάντια του ποντικίσιου νευροβλαστώματος¹⁴². Έχει καταγραφεί η αντιοξειδωτική της δράση με διάφορες τεχνικές εκχύλισης, με το μεθανολικό εκχύλισμα να εμφανίζει τη μέγιστη ικανότητα εξουδετέρωσης DPPH⁴⁴. Σε ανθρώπινα κύτταρα κερατοειδούς, έχουν προσδιοριστεί οι αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητες και κυτταροτοξικές ιδιότητες επτανικού εκχυλίσματος ευφρασίας⁴⁴. Από το εκχύλισμα ευφρασίας με 70% MeOH σημειώθηκε αναστολή της αύξησης των κυττάρων K562 με μείωση της ενεργότητας κασπάσης-3. Το *M. chamomilla* περιέχει οξείδιο α-βισαβολόλης, το οποίο αναστέλλει την αύξηση του πληθυσμού των K562 κυττάρων και έχει ήπια κυτταροτοξική δράση¹⁴³. Έτσι και στα αποτελέσματα των πειραμάτων βρέθηκε πως υπάρχει σημαντική αναστολή της αύξησης των K562 σε αριθμό και μείωση της ενεργής κασπάσης-3. Η κυτταροτοξική δράση του χαμομηλιού έχει σημειωθεί σε καρκινικά κύτταρα K562, και συγκριτικά με της καλέντουλας, φαίνεται να είναι ισχυρότερη, όταν και τα δύο χορηγούνται υπό μορφή ροφήματος¹⁴⁴. Το εκχύλισμα με ζεστό νερό της *C. officinalis* παρουσιάζει κυτταροτοξική δράση έναντι των K562 με $IC_{50}=0.87$ mg/ml^{27,144}. Το αιθανολικό εκχύλισμα της καλέντουλας εμφάνισε μείωση του κυτταρικού πληθυσμού K562 και ήπια μείωση της ενεργής κασπάσης-3. Τα φυτά της οικογένειας *Rosaceae* (όπως *R. canina*) περιέχουν β-ιονόνη, η οποία καταστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε συγκεντρώσεις 25 µM και σε συγκεντρώσεις 200 µM αυξάνει την απόπτωση σε κύτταρα K562¹⁴⁵. Η *R. canina* σε συγκεντρώσεις μικρότερες από 0.2mg/ml (εκχύλιση με DMSO και 1% οξικό οξύ) έχει παρουσιάσει κυτταροτοξική δράση σε άλλες καρκινικές σειρές, με αύξηση της ενεργότητας κασπάσης⁵⁴. Στην παρούσα εργασία το κυνόροδο σε συγκέντρωση 1.83 mg/ml εμφάνισε μερική μείωση των κυττάρων K562 και σχεδόν πλήρη αναστολή της ενεργής κασπάσης-3. Εκχύλισμα φύλλων *M. alba* έχει απεδειχθεί πως αναστέλλει την αύξηση κυττάρων ανθρώπινης προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας (HL-60) με $IC_{50} = 1.47$ mg/ml, η εκχύλιση έγινε σε 70% μεθανόλη, με υδρολυμένα σε οξύ φύλλα¹⁴⁶. Το χλωρογενικό οξύ που εμπεριέχεται στο *M. alba* προκαλεί απόπτωση των κυττάρων χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας¹⁴⁶. Το εκχύλισμα των φρούτων *M. alba* σε συγκέντρωση 2.78 mg/ml ανέστειλε την αύξηση των κυττάρων και προκάλεσε μείωση της ενεργότητας κασπάσης-3 στα K562. Η πρόπολη ανέστειλε την κυτταρική αύξηση των K562 και μείωσε την ενεργή κασπάση-3. Η πρόπολη όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 1.7.12 διαφέρει ανάλογα την περιοχή συλλογής της. Επιπλέον διαφορετικά είδη πρόπολης από την ίδια περιοχή (Βραζιλία) έχουν επιδείξει διαφορετική επίδραση στα K562, καθώς εμφάνιζαν κυτταροτοξικότητα σε διαφορετικό βαθμό¹⁴⁷. Η *O. vulgare* ανέστειλε την κυτταρική αύξηση και μείωσε την ενεργή κασπάση-3. Η ρίγανη, όπως και το θυμάρι περιέχει καρβακρόλη η οποία έχει αποδειχθεί πως έχει αντιπολλαπλασιαστική

δράση σε διάφορα είδη καρκινικών κυττάρων, μεταξύ των οποίων βρίσκονται και τα K562¹⁴⁸. Το μεθανολικό εκχύλισμα της *O. Sipyleum* έχει αποδειχθεί πως επάγει την αναστολή του πολλαπλασιασμού και του κυτταρικού κύκλου των K562, ενώ προωθεί και την απόπτωσή τους¹⁴⁹. Το *H. perforatum* έχει κυτταροτοξική και κυτταροστατική δράση στα K562¹⁵⁰. Στην δράση αυτή συμμετέχουν και οι υπερισίνες του φυτού¹⁵⁰. Το εκχύλισμα του σπαθόχορτου μείωσε την ανάπτυξη των κυττάρων και ελάττωσε την ενεργότητα της κασπάσης-3. Εκχυλίσματα μαύρου φραγκοστάφυλλου (*R. nigrum*) αναστέλλουν την ανάπτυξη διάφορων καρκινικών κυττάρων όπως είναι τα λευχαιμικά κύτταρα ανθρώπου HL-60¹⁵¹. Στα K562 οδήγησε σε αναστολή της ανάπτυξης και στατιστικά ασήμαντη μείωση της ενεργής κασπάσης-3. Φυτικά εκχυλίσματα με κυτταροτοξικότητα επιπέδου $IC_{50} < 30 \mu\text{g/ml}$ μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την απομόνωση των δραστικών συστατικών και με βάση αυτές τις δομές να σχεδιασθούν πιο δραστικά μόρια για μελλοντική ανάπτυξη αντικαρκινικών φαρμάκων¹³⁹.

Από τις συνθετικές ενώσεις η 32 (παράγωγο β-ιονόνης) και η 64 (παράγωγο χαλκόνης) προκάλεσαν σημαντική αύξηση (μεγαλύτερη από 2 φορές) της ενεργότητας κασπάσης-3 στα κύτταρα K562. Η ένωση 32 προκάλεσε αναστολή της αύξησης των κυττάρων κατά $52.3 \pm 4.42\%$, ενώ η ένωση 64 οδήγησε σε μείωση του αριθμού των κυττάρων κατά μόλις $19.34 \pm 3.56\%$. Από την άλλη οι ενώσεις 6 και 38 (παράγωγα β-ιονόνης) και οι ενώσεις 9 και 10 (παράγωγα χαλκόνης) μείωσαν την ενεργότητα της κασπάσης περισσότερο από 3 φορές, με τις ενώσεις 6 και 9 να αναστέλλουν την κυτταρική ανάπτυξη σε πολύ μικρό βαθμό ($14.12 \pm 6.11\%$ και $20.94 \pm 15.38\%$ αντιστοίχως), όμοιο με την αναστολή της ένωσης 64, ενώ οι ενώσεις 10 και 38 μείωσαν την κυτταρική ανάπτυξη κατά $42.97 \pm 6.52\%$ και $45.8 \pm 7.48\%$ αντίστοιχα. Επομένως, οι διαφορετικοί υποκαταστάτες των ενώσεων είχαν μια τελείως διαφορετική επίδραση στην κυτταρική ανάπτυξη και την απόπτωση των κυττάρων K562. Η 10 και η 38 έχουν έναν 5-μελή δακτύλιο με άζωτο (πυρρόλιο για την ένωση 10 και μέρος ινδολίου για την ένωση 38), που πιθανώς παίζει ρόλο στη δράση των ενώσεων εντός των κυττάρων. Άλλα παράγωγα ινδολίου έχουν επιδείξει αντιπολλαπλασιαστική και προαποπτωτική δράση στα κύτταρα K562^{152,153}. Η τριφθορομεθυλομάδα που είναι κοινή και στις 3 χαλκόνες δεν φαίνεται να οδηγεί σε όμοια δράση. Η ευγενόλη, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας ανέστειλε την αύξηση των κυττάρων κατά $40.5 \pm 2.38\%$, όταν χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση $16.67 \mu\text{M}$ ($2.73 \mu\text{g/ml}$). Σύμφωνα με τους Zarlaha και συν. η IC_{50} της ευγενόλης στα κύτταρα K562 είχε προσδιοριστεί στα $(10.18 \pm 2.77 \mu\text{g/ml})$ ¹⁵⁴.

3. Επίδραση των φυτικών εκχυλισμάτων και χημικών ενώσεων στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2

Η ευγενόλη ως γνωστός επαγωγέας του Nrf2¹⁵⁵, αυξορρύθμισε τα γονίδια στόχους του Nrf2. Η Ένωση 6, όπως και η ένωση 32 είναι παράγωγα β-ιονόνης και οδήγησαν σε αύξηση της έκφρασης των γονιδίων στόχων του Nrf2. Το εκχύλισμα της μορίγγκας αυξορρύθμισε τα γονίδια-στόχους του Nrf2 όπως και αναφέρεται στη βιβλιογραφία σε άλλα είδη κυττάρων⁵⁸. Το φασκόμηλο περιέχει ενώσεις που ενεργοποιούν τον Nrf2⁷⁵, σε συμφωνία με αυτό έρχονται και τα αποτελέσματα του πειράματος όπου αυξήθηκε η έκφραση των γονιδίων *HO-1*, *NQO1*, *GCLC* μετά

τη χορήγηση εκχυλίσματος φασκόμηλου. Το δεντρολίβανο, γνωστός επαγωγέας του Nrf2 σε διάφορα είδη κυττάρων¹⁵⁶, προκάλεσε μειορρύθμιση των γονιδίων *HO-1* και *NQO1* ενώ αύξησε την έκφραση του *GCLC*, η διαφορετική αυτή δράση στα γονίδια στόχους του Nrf2 θα μπορούσε να οφείλεται σε δράση του δεντρολίβανου σε διαφορετικούς μεταγραφικούς παράγοντες στο κύτταρο, που επηρεάζουν τον *GCLC*¹⁵⁷. Το θυμάρι προκάλεσε αύξηση της έκφρασης και των τριών γονιδίων στόχων του Nrf2 που δοκιμάστηκαν, το οποίο έρχεται σε συμφωνία με την ικανότητα επαγωγής του Nrf2 από το θυμάρι, όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία⁴⁷.

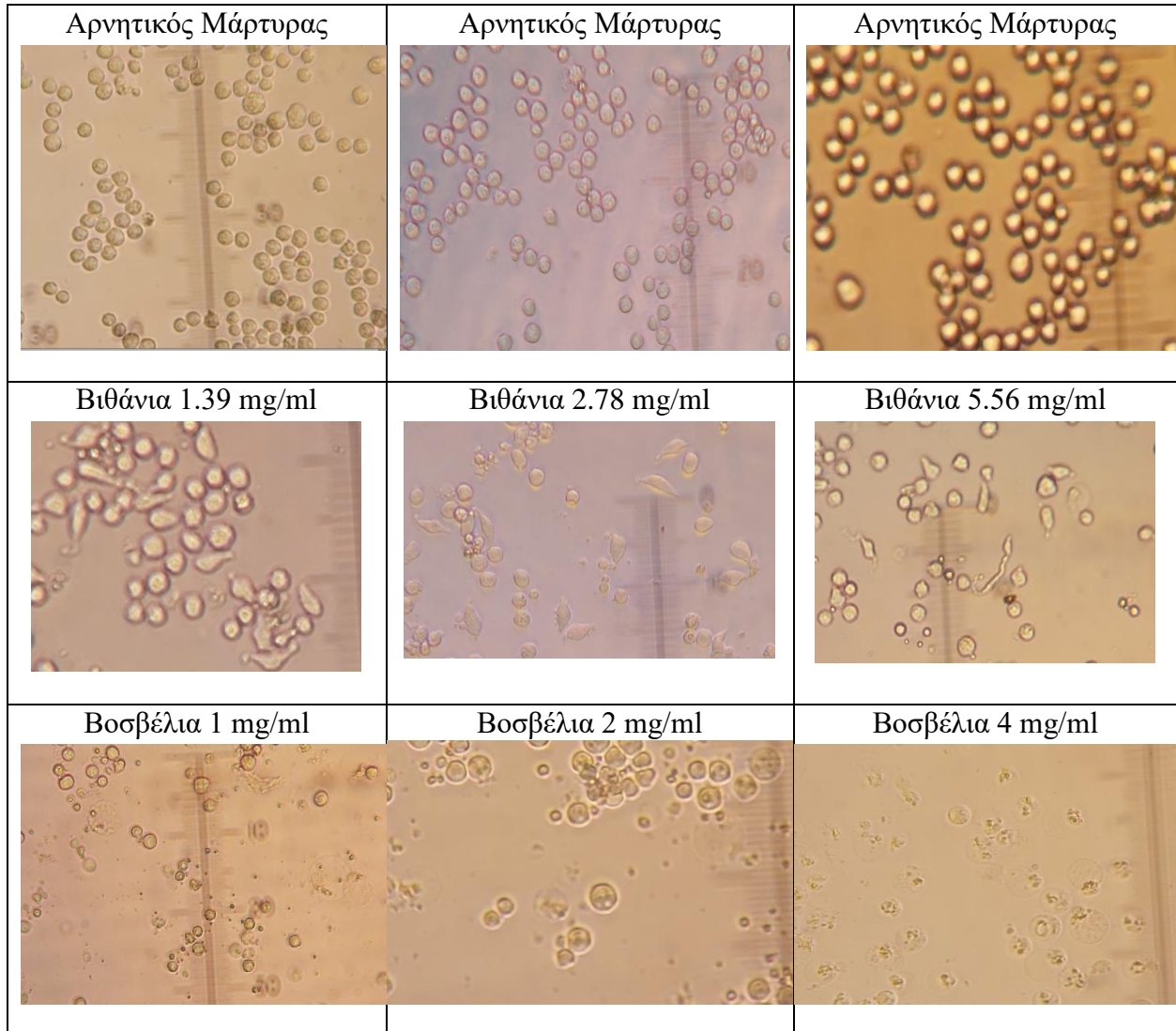
4. Συμπεράσματα

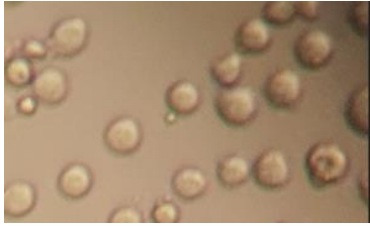
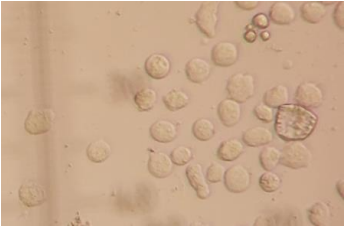
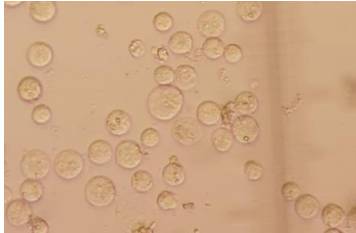
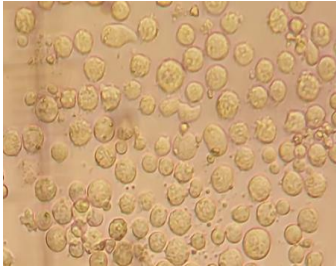
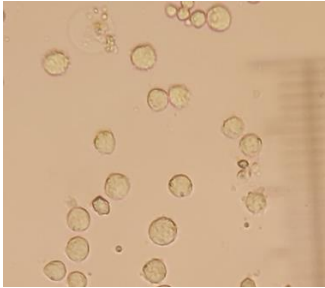
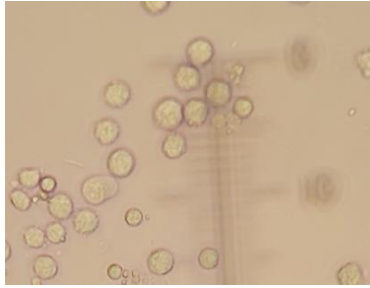
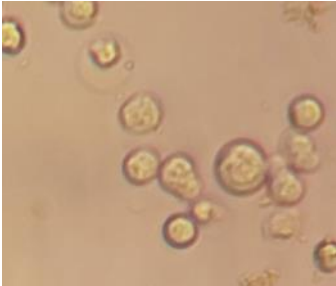
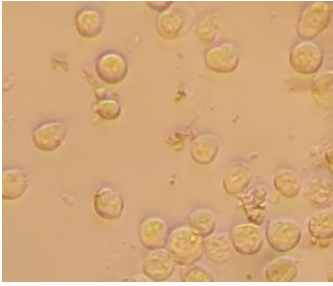
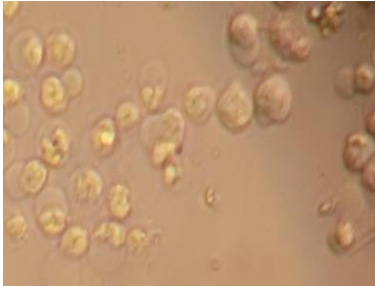
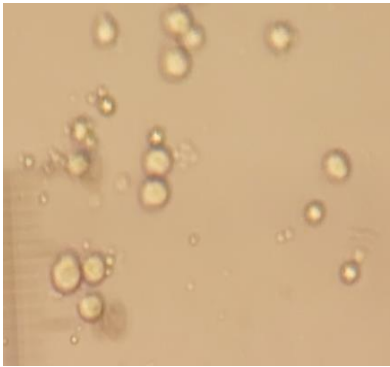
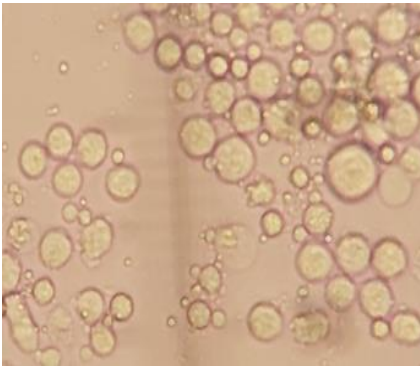
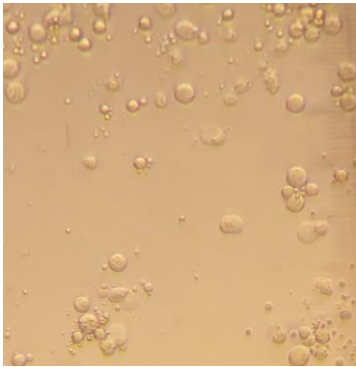
Τα φυσικά προϊόντα αποτελούν πηγή αντιοξειδωτικών ουσιών και ενώσεων που μπορούν να λειτουργήσουν ως πρότυπα για την ανάπτυξη συνθετικών ενώσεων-φαρμάκων. Το περιεχόμενο κάθε φυτού είναι δυνατό να διαφέρει ανάλογα την προέλευση του και τις συνθήκες καλλιέργειας. Οι διαφορές αυτές γίνονται μεγαλύτερες σε διαφορετικά εκχυλίσματα του ίδιου φυτού, καθώς τα διάφορα είδη διαλυτών, έχουν συγκεκριμένες φυσικοχημικές ιδιότητες με αποτέλεσμα την απομόνωση ορισμένων συστατικών. Έτσι, η αντιοξειδωτική δράση ενός είδους φυτού είναι δυνατό να παρουσιάζει διαφορές μεταξύ των μελετών που γίνονται. Στην εργασία αυτή προσδιορίστηκαν φυσικά προϊόντα με σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Προσδιορίστηκαν φυσικά προϊόντα - επαγωγείς του Nrf2, αφού αυξορρύθμισαν 3 από τα γονίδια στόχους του Nrf2. Το δεντρολίβανο σε αντίθεση με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, όπου αναφέρεται ως επαγωγέας του Nrf2, εδώ παρουσίασε αμφιλεγόμενη δράση, με την αυξορρύθμιση ενός μόνο γονιδίου στόχου του Nrf2 και τη μειορρύθμιση των άλλων δύο. Επιπλέον πειράματα με το δεντρολίβανο, μπορούν να διαλευκάνουν την επίδρασή του στα μοριακά μονοπάτια του κυττάρου. Διάφορα παράγωγα της β-ιονόνης και της χαλκόνης εμφάνισαν σημαντική αντιοξειδωτική δράση, ενώ παράγωγα της χαλκόνης εμφάνισαν υψηλή σταθερά αντίδρασης με την κυστεΐνη και την κυστεαμίνη. Από τα παράγωγα β-ιονόνης, 2 αυξορρύθμισαν και τα 3 γονίδια στόχους του Nrf2, αποτελέσματα που συνηγορούν στην ενεργοποίηση του Nrf2. Η ευγενόλη αν και είχε τη μέγιστη αντιοξειδωτική δράση συγκριτικά με τις υπόλοιπες συνθετικές ενώσεις, επέδειξε μικρότερη αύξηση των γονιδίων στόχων του Nrf2 συγκριτικά με την ένωση 32. Επιπλέον, η 32 είχε αυξημένη αντιοξειδωτική δράση συγκριτικά με τις υπόλοιπες ενώσεις και προκάλεσε σημαντική αύξηση της έκφρασης των γονιδίων στόχων. Η ένωση 32 επέδειξε σχετικά μικρή σταθερά αντίδρασης κατά την αντίδραση με θειόλες, το οποίο μπορεί να ευνοεί την αντίδραση με την Keap1, αφού αυξάνεται η ειδικότητα προς τις δραστικές κυστεΐνες και μειώνονται οι μη ειδικές αλληλεπιδράσεις.

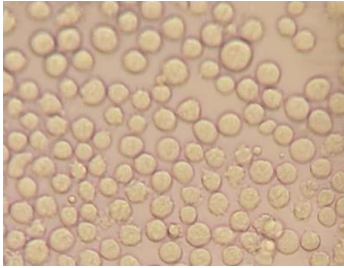
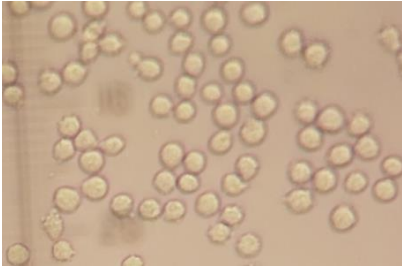
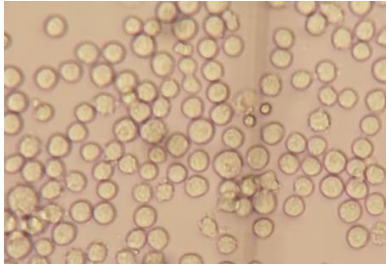
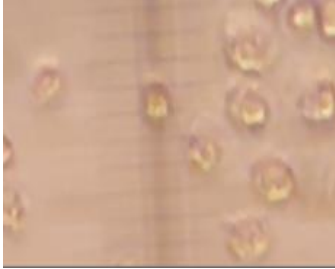
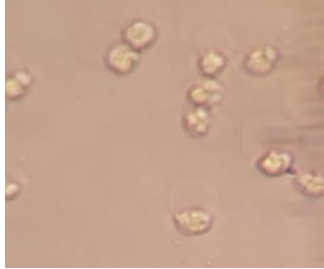
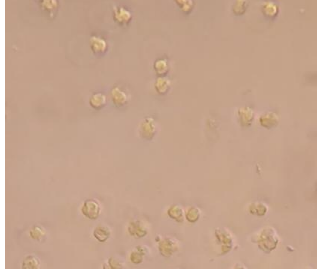


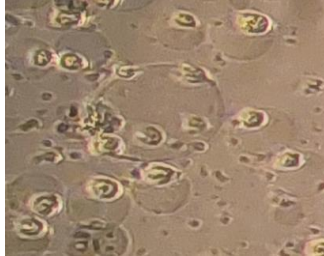
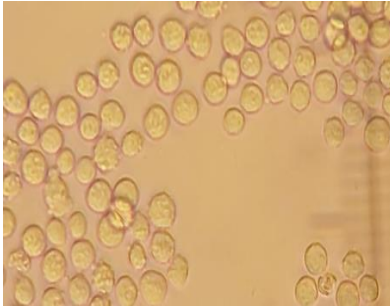
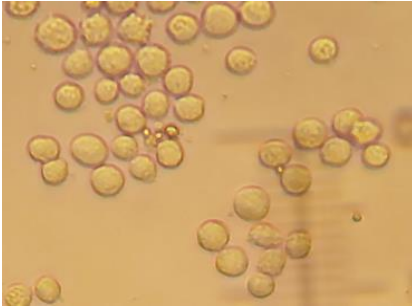
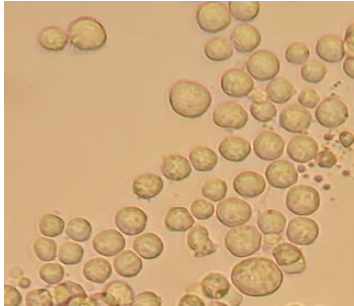
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α: ΚΥΤΤΑΡΑ

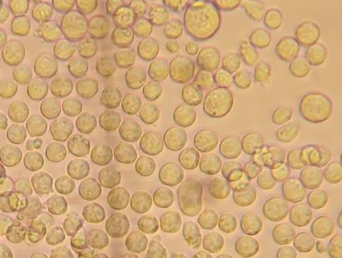
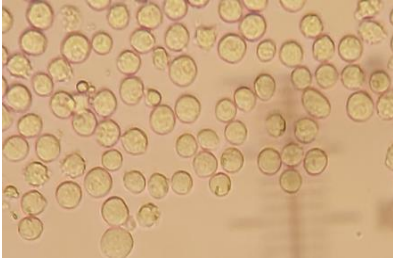
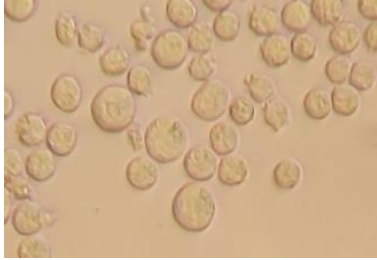
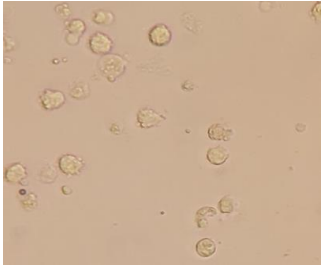
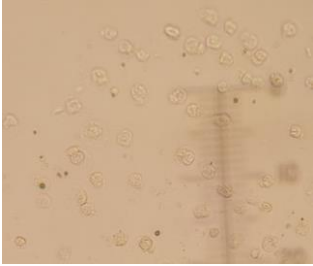
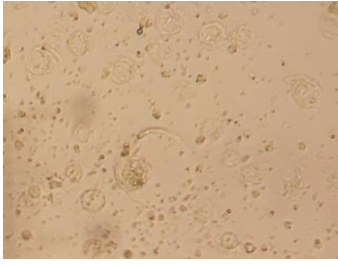
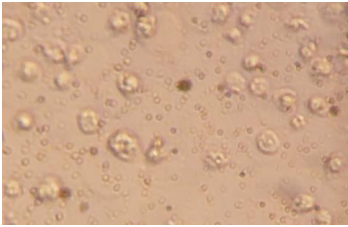
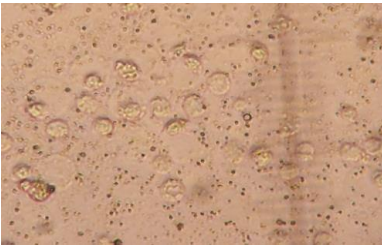
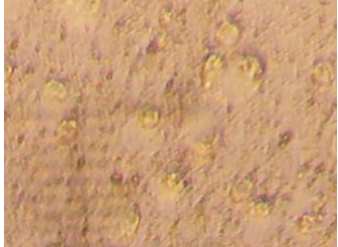
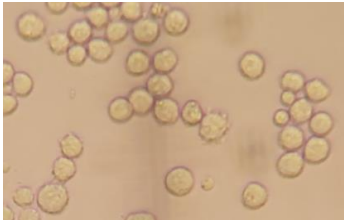
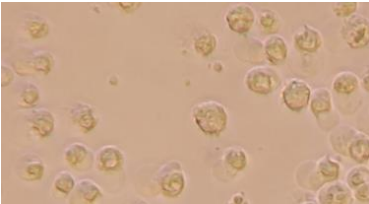
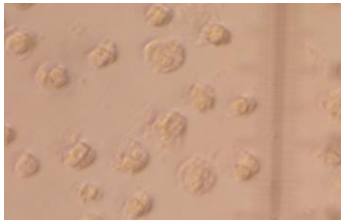
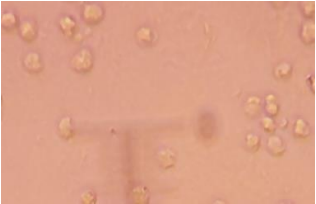
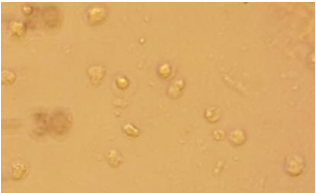
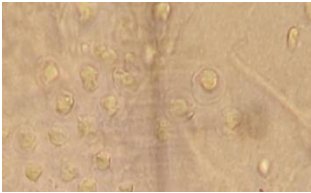
Στο παράρτημα Α παρουσιάζονται οι Φωτογραφίες των Κυττάρων K562 μετά από επώαση με κάθε ουσία για 24h ή 48h.

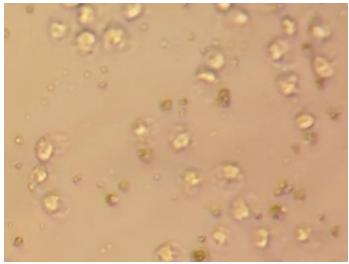
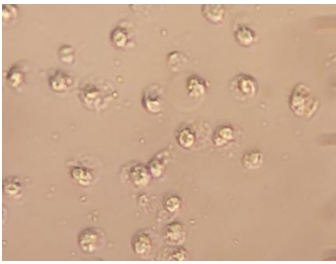
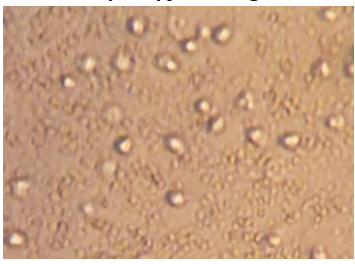
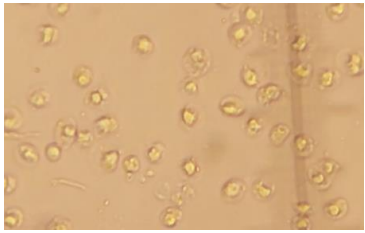

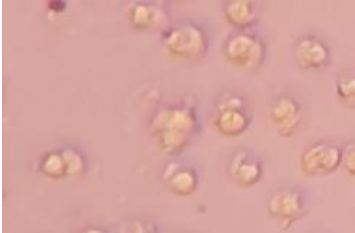
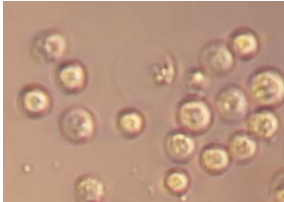
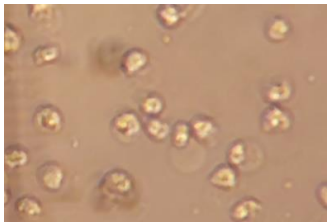
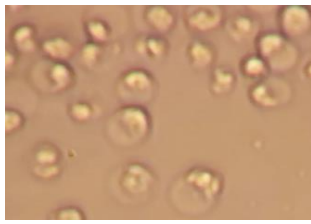
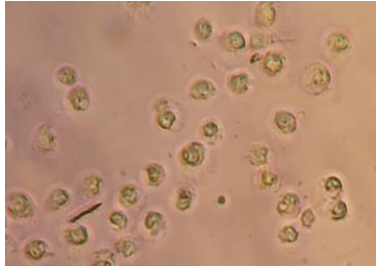
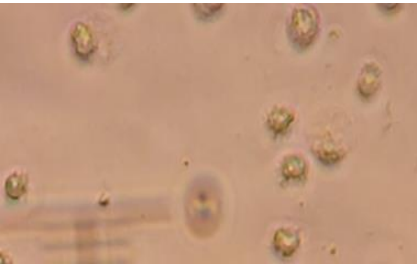
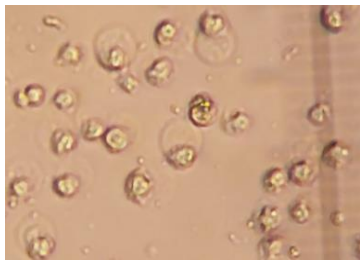
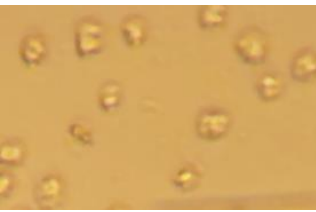
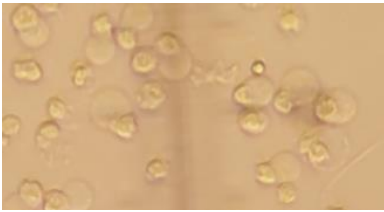
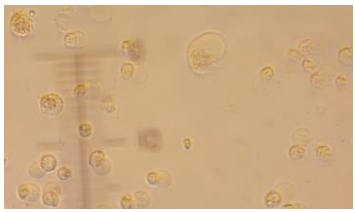
Φωτογραφίες μετά από 24h επώαση των κυττάρων με κάθε δείγμα (Μεγέθυνση x840 σε όλες τις εικόνες).



<p>Γαϊδουράγκαθο Σπόρος 1.56 mg/ml</p> 	<p>Γαϊδουράγκαθο Σπόρος 3.125 mg/ml</p> 	<p>Γαϊδουράγκαθο Σπόρος 6.25 mg/ml</p> 
<p>Γαϊδουράγκαθο Φύλλο 1.92 mg/ml</p> 	<p>Γαϊδουράγκαθο Φύλλο 3.85 mg/ml</p> 	<p>Γαϊδουράγκαθο Φύλλο 7.69 mg/ml</p> 
<p>Δεντρολίβανο 0.625 mg/ml</p> 	<p>Δεντρολίβανο 1.25 mg/ml</p> 	<p>Δεντρολίβανο 2.5 mg/ml</p> 
<p>Ελιά 0.83 mg/ml</p> 	<p>Ελιά 1.67 mg/ml</p> 	<p>Ελιά 3.33 mg/ml</p> 

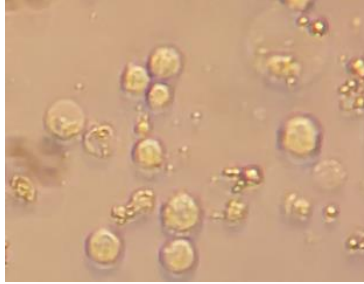
<p>Ευφρασία 1.04 mg/ml</p> 	<p>Ευφρασία 2.08 mg/ml</p> 	<p>Ευφρασία 4.17 mg/ml</p> 
<p>Θυμάρι 1.14 mg/ml</p> 	<p>Θυμάρι 2.27 mg/ml</p> 	<p>Θυμάρι 4.55 mg/ml</p> 
<p>Καλέντουλα 1.19 mg/ml</p> 	<p>Καλέντουλα 2.38 mg/ml</p> 	<p>Καλέντουλα 4.76 mg/ml</p> 
<p>Κυνόροδο 1.39 mg/ml</p> 	<p>Κυνόροδο 2.78 mg/ml</p> 	<p>Κυνόροδο 5.56 mg/ml</p> 

<p>Λευκό Μούρο 1.04 mg/ml</p> 	<p>Λευκό Μούρο 2.08 mg/ml</p> 	<p>Λευκό Μούρο 4.17 mg/ml</p> 
<p>Μορίνγκα 2.5 mg/ml</p> 	<p>Μορίνγκα 5 mg/ml</p> 	<p>Μορίνγκα 10 mg/ml</p> 
<p>Πρόπολη 0.96 mg/ml</p> 	<p>Πρόπολη 1.92 mg/ml</p> 	<p>Πρόπολη 3.85 mg/ml</p> 
<p>Ρίγανη 0.83 mg/ml</p> 	<p>Ρίγανη 1.67 mg/ml</p> 	<p>Ρίγανη 3.33 mg/ml</p> 
<p>Ροδιόλα 1.19 mg/ml</p> 	<p>Ροδιόλα 2.38 mg/ml</p> 	<p>Ροδιόλα 4.76 mg/ml</p> 

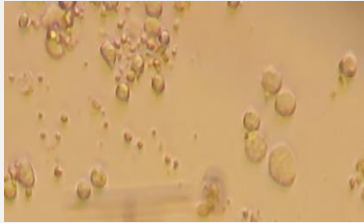
Σιδερίτης 2.5 mg/ml 	Σιδερίτης 5 mg/ml 	Σιδερίτης 10 mg/ml 
Σπαθόχορτο 1.32 mg/ml 	Σπαθόχορτο 2.63 mg/ml 	Σπαθόχορτο 5.36 mg/ml 
Φασκόμηλο 0.625 mg/ml 	Φασκόμηλο 1.25 mg/ml 	Φασκόμηλο 2.5 mg/ml 
Φραγκοστάφυλλο 0.81 mg/ml 	Φραγκοστάφυλλο 1.61 mg/ml 	Φραγκοστάφυλλο 3.23 mg/ml 
Χαμομήλι 1.34 mg/ml 	Χαμομήλι 2.68 mg/ml 	Χαμομήλι 5.36 mg/ml 

Φωτογραφίες 1: Ενδεικτικές εικόνες κυττάρων μετά από 24h επώαση με τα φυσικά εκχυλίσματα. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε δοκιμή αναγράφονται πάνω από την εικόνα.

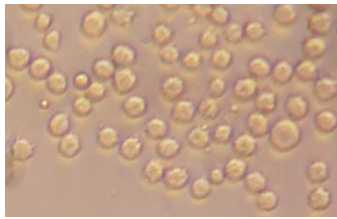
Ένωση 6



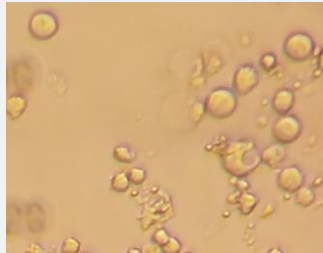
Ένωση 7



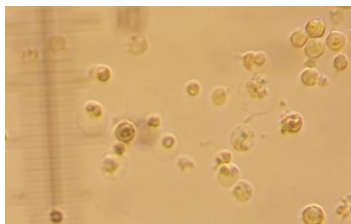
Ένωση 8



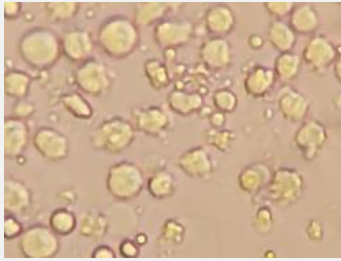
Ένωση 9



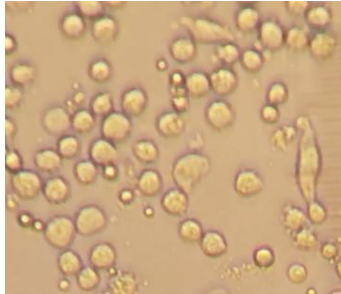
Ένωση 10



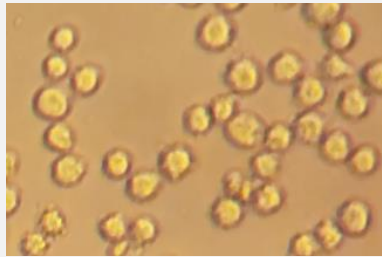
Ένωση 13



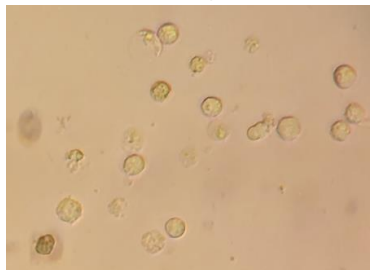
Ένωση 16



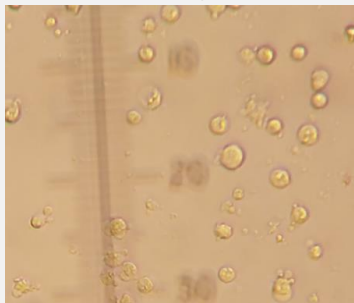
Ένωση 18



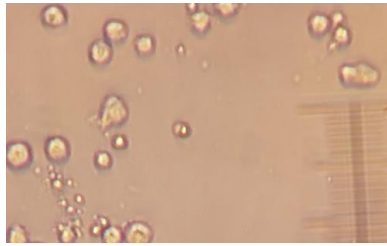
Ένωση 23



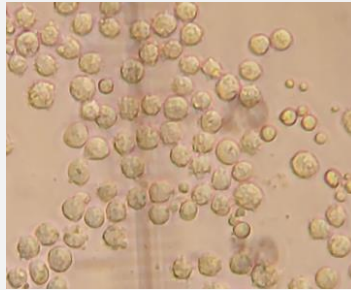
Ένωση 31



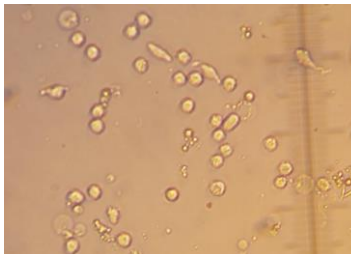
Ένωση 32



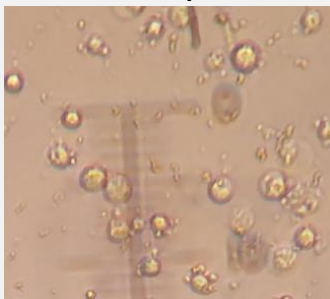
Ένωση 33



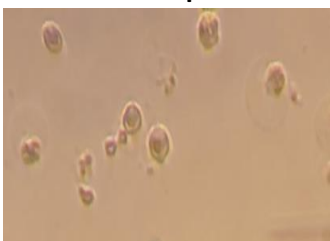
Ένωση 38



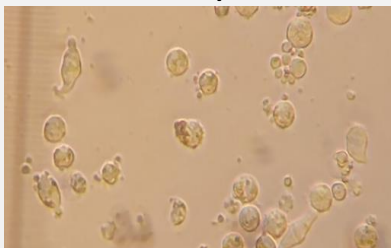
Ένωση 47



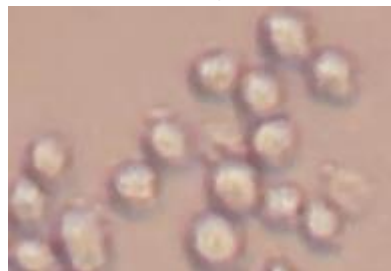
Ένωση 57



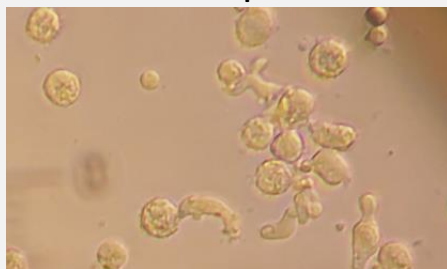
Ένωση 61



Ένωση 64

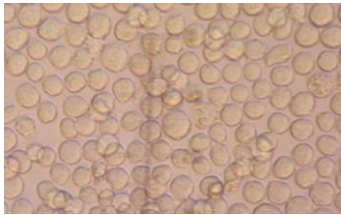
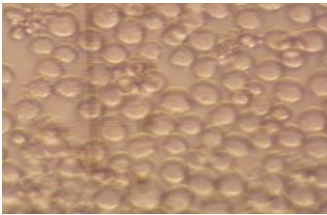
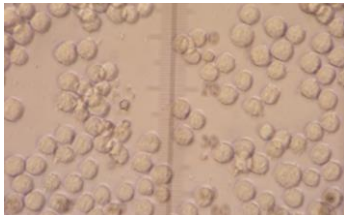
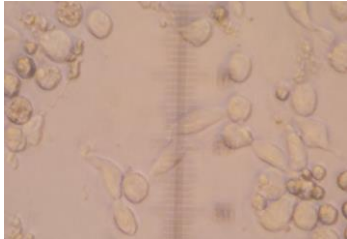
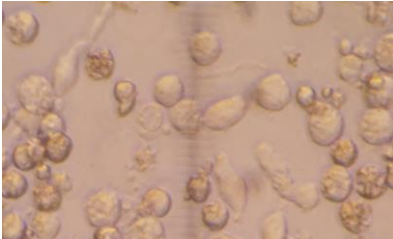
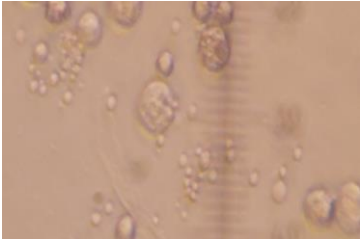
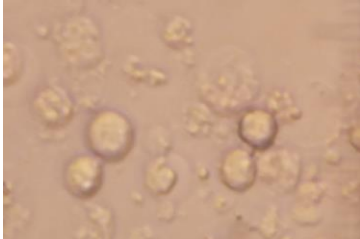

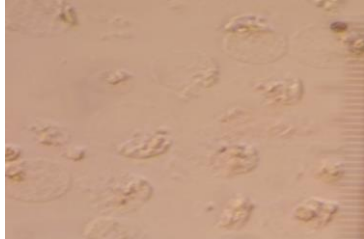
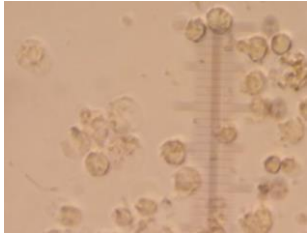
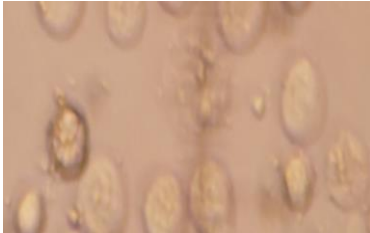
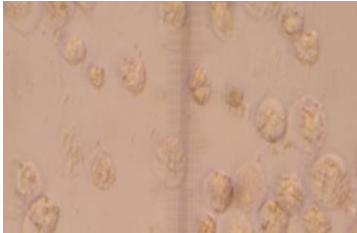


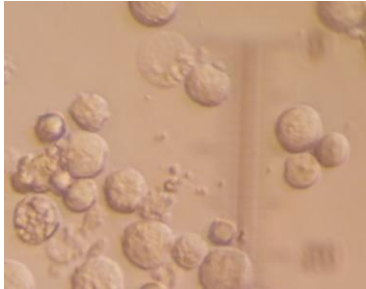
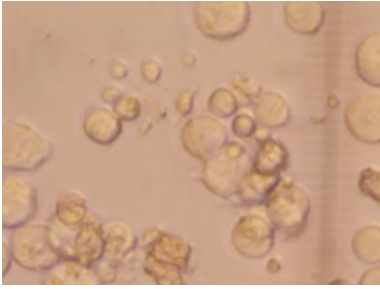
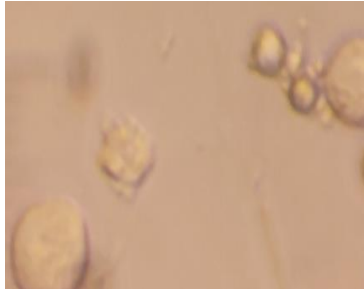
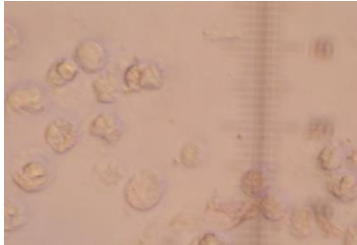
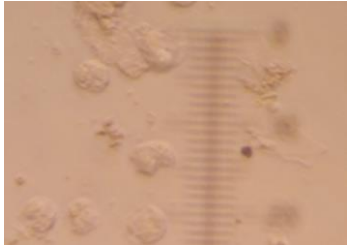
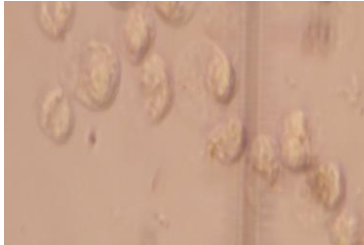
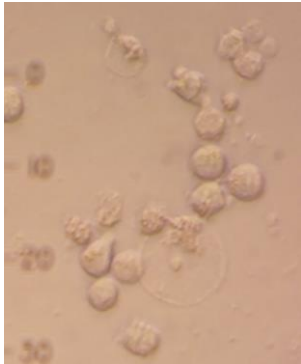
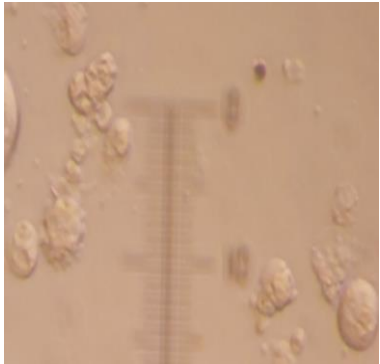
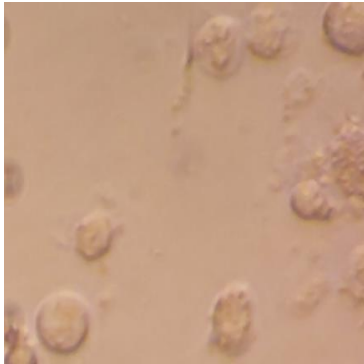
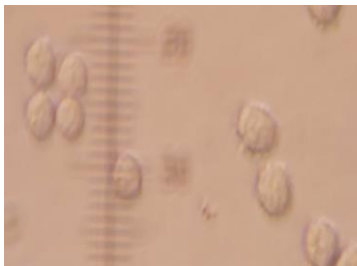
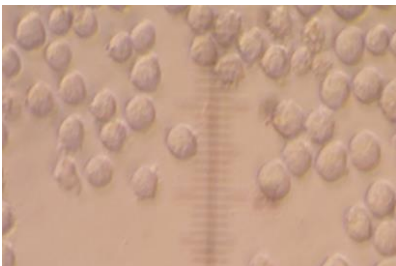

Ένωση 70

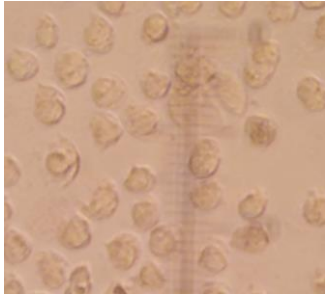
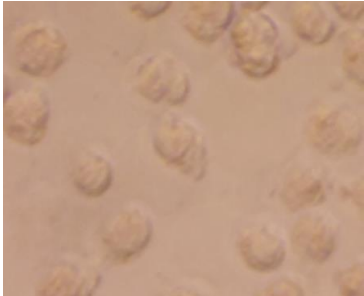
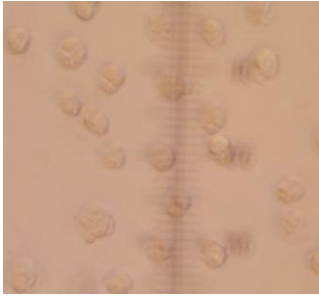

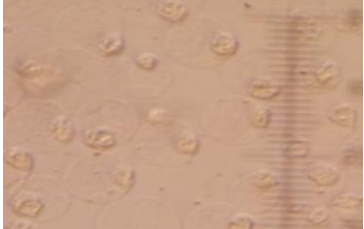

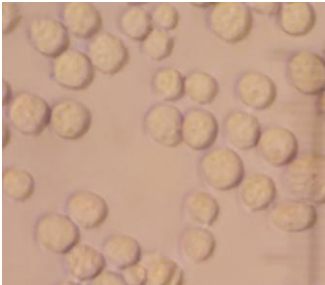
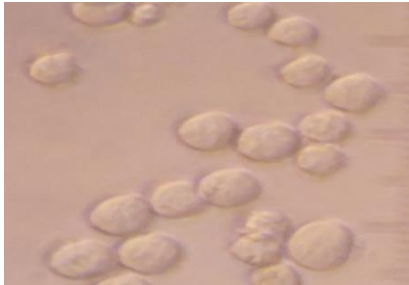


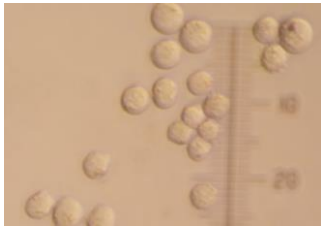
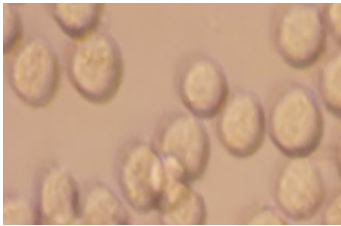
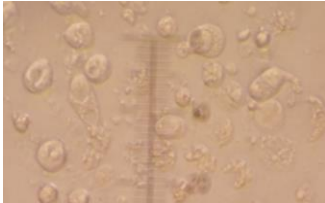

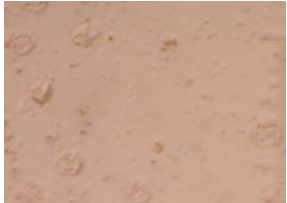


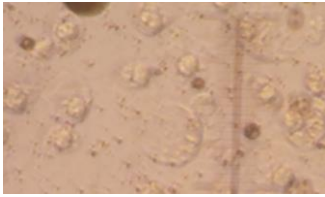
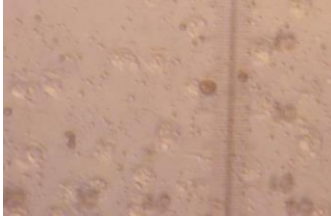
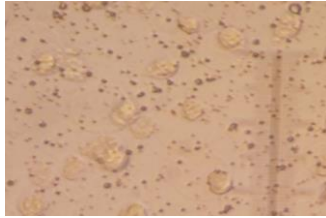
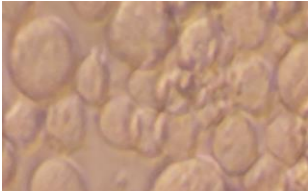
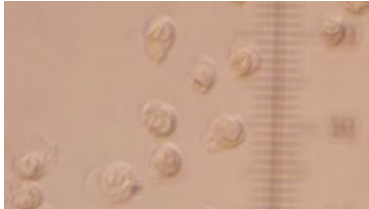
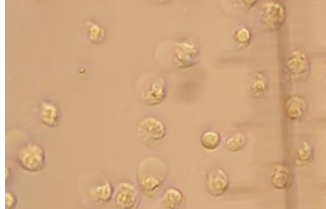
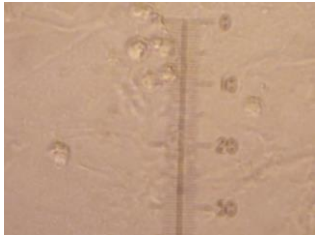
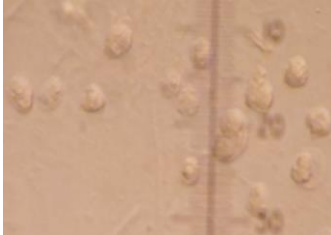

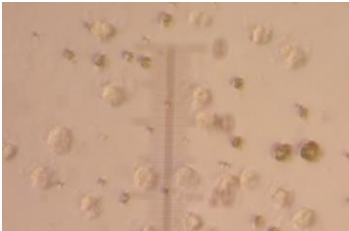
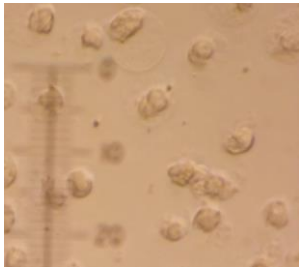
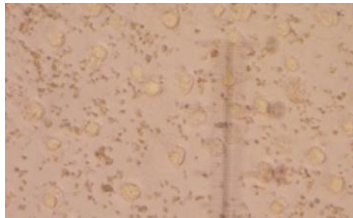

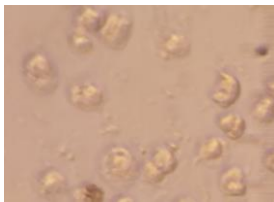
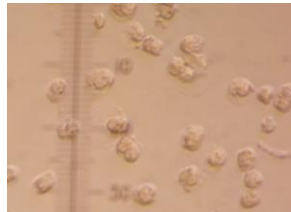
Φωτογραφίες 2: Ενδεικτικές εικόνες των κυττάρων μετά από 24h επώαση με την κάθε ένωση. Οι δοκιμές έγιναν με 0.05mM ένωσης.

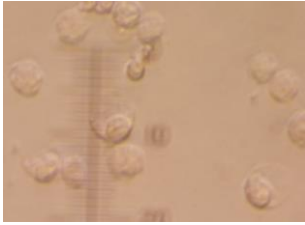
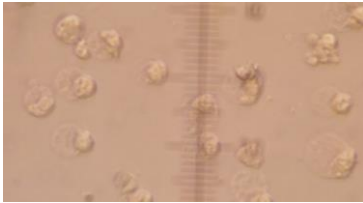
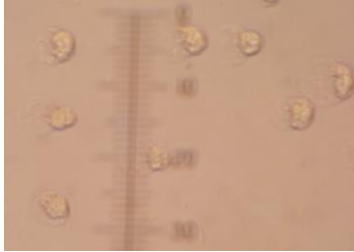
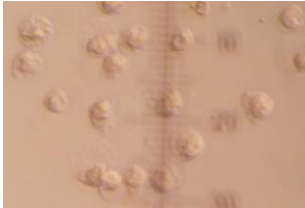
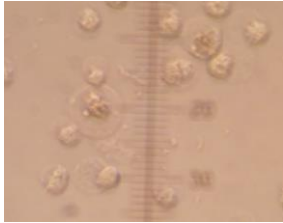
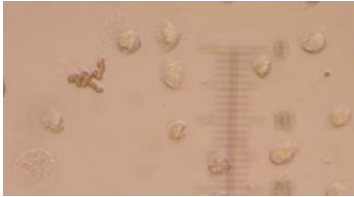

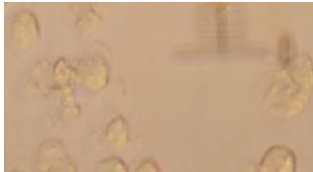
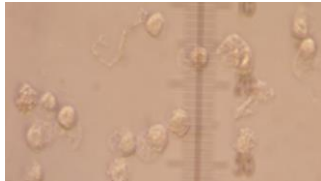
Φωτογραφίες μετά από 24h επώαση των κυττάρων με κάθε δείγμα (Μεγέθυνση x840 σε όλες τις εικόνες).

Αρνητικός Μάρτυρας 	Αρνητικός Μάρτυρας 	Αρνητικός Μάρτυρας 
Βιθάνια 1.39 mg/ml 	Βιθάνια 2.78 mg/ml 	Βιθάνια 5.56 mg/ml 
Βοσβέλια 1 mg/ml 	Βοσβέλια 2 mg/ml 	Βοσβέλια 4 mg/ml 
Γαϊδουράγκαθο Σπόρος 1.56 mg/ml 	Γαϊδουράγκαθο Σπόρος 3.125 mg/ml 	Γαϊδουράγκαθο Σπόρος 6.25 mg/ml 

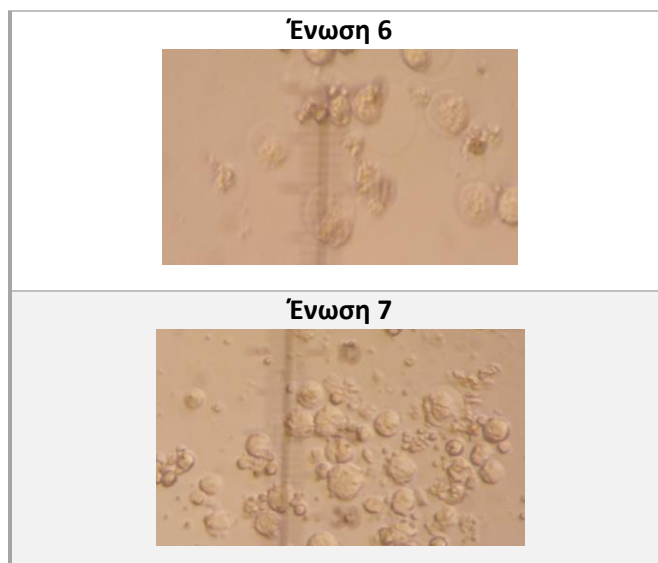
<p>Γαϊδουράγκαθο Φύλλο 1.92 mg/ml</p> 	<p>Γαϊδουράγκαθο Φύλλο 3.85 mg/ml</p> 	<p>Γαϊδουράγκαθο Φύλλο 7.69 mg/ml</p> 
<p>Δεντρολίβανο 0.625 mg/ml</p> 	<p>Δεντρολίβανο 1.25 mg/ml</p> 	<p>Δεντρολίβανο 2.5 mg/ml</p> 
<p>Ελιά 0.83 mg/ml</p> 	<p>Ελιά 1.67 mg/ml</p> 	<p>Ελιά 3.33 mg/ml</p> 
<p>Ευφρασία 1.04 mg/ml</p> 	<p>Ευφρασία 2.08 mg/ml</p> 	<p>Ευφρασία 4.17 mg/ml</p> 

<p>Θυμάρι 1.14 mg/ml</p> 	<p>Θυμάρι 2.27 mg/ml</p> 	<p>Θυμάρι 4.55 mg/ml</p> 
<p>Καλέντουλα 1.19 mg/ml</p> 	<p>Καλέντουλα 2.38 mg/ml</p> 	<p>Καλέντουλα 4.76 mg/ml</p> 
<p>Κυνόροδο 1.39 mg/ml</p> 	<p>Κυνόροδο 2.78 mg/ml</p> 	<p>Κυνόροδο 5.56 mg/ml</p> 
<p>Λευκό Μούρο 1.04 mg/ml</p> 	<p>Λευκό Μούρο 2.08 mg/ml</p> 	<p>Λευκό Μούρο 4.17 mg/ml</p> 
<p>Μορίνγκα 2.5 mg/ml</p> 	<p>Μορίνγκα 5 mg/ml</p> 	<p>Μορίνγκα 10 mg/ml</p> 

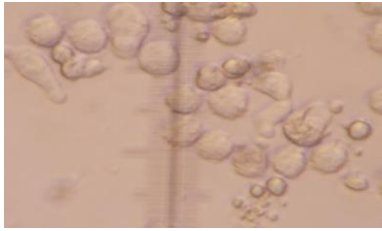
<p>Πρόπολη 0.96 mg/ml</p> 	<p>Πρόπολη 1.92 mg/ml</p> 	<p>Πρόπολη 3.85 mg/ml</p> 
<p>Ρίγανη 0.83 mg/ml</p> 	<p>Ρίγανη 1.67 mg/ml</p> 	<p>Ρίγανη 3.33 mg/ml</p> 
<p>Ροδιόλα 1.19 mg/ml</p> 	<p>Ροδιόλα 2.38 mg/ml</p> 	<p>Ροδιόλα 4.76 mg/ml</p> 
<p>Σιδερίτης 2.5 mg/ml</p> 	<p>Σιδερίτης 5 mg/ml</p> 	<p>Σιδερίτης 10 mg/ml</p> 
<p>Σπαθόχορτο 1.32 mg/ml</p> 	<p>Σπαθόχορτο 2.63 mg/ml</p> 	<p>Σπαθόχορτο 5.36 mg/ml</p> 

<p>Φασκόμηλο 0.625 mg/ml</p> 	<p>Φασκόμηλο 1.25 mg/ml</p> 	<p>Φασκόμηλο 2.5 mg/ml</p> 
<p>Φραγκοστάφυλλο 0.81 mg/ml</p> 	<p>Φραγκοστάφυλλο 1.61 mg/ml</p> 	<p>Φραγκοστάφυλλο 3.23 mg/ml</p> 
<p>Χαμομήλι 1.34 mg/ml</p> 	<p>Χαμομήλι 2.68 mg/ml</p> 	<p>Χαμομήλι 5.36 mg/ml</p> 

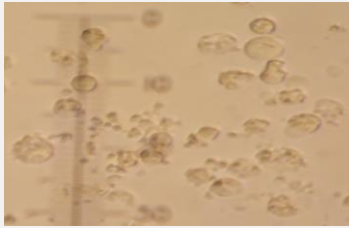
Φωτογραφίες 3 Ενδεικτικές εικόνες κυττάρων μετά από 24h επώαση με τα φυσικά εκχυλίσματα. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε δοκιμή αναγράφονται πάνω από την εικόνα.



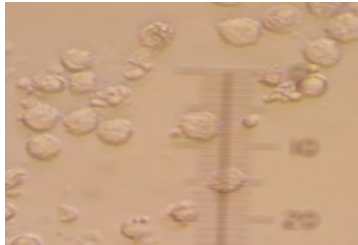
Ένωση 8



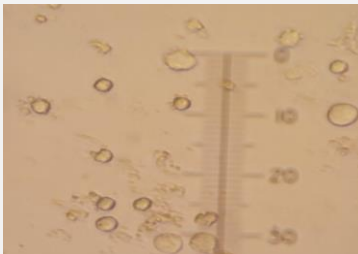
Ένωση 9



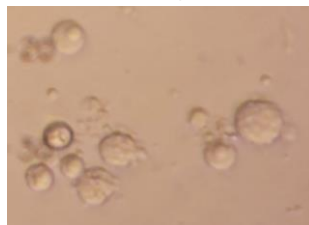
Ένωση 10



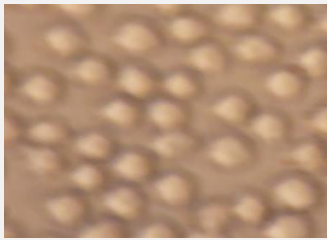
Ένωση 13



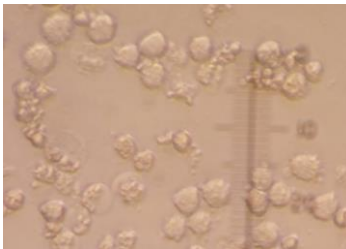
Ένωση 16



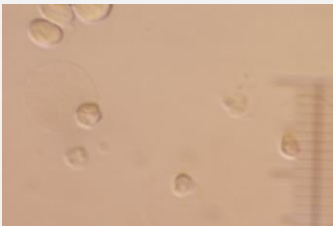
Ένωση 18



Ένωση 23



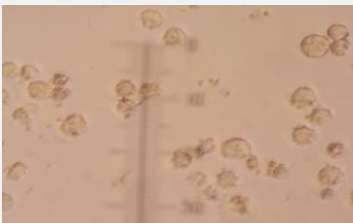
Ένωση 31



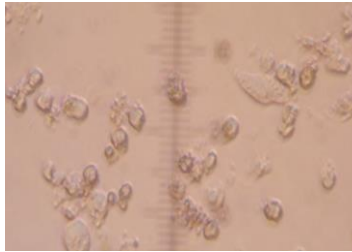
Ένωση 32



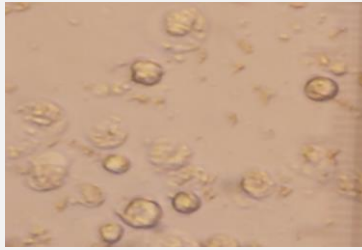
Ένωση 33



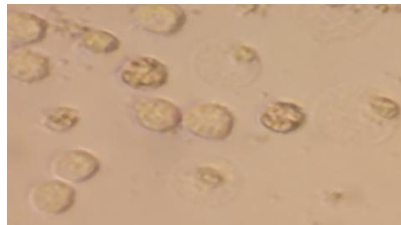
Ένωση 38



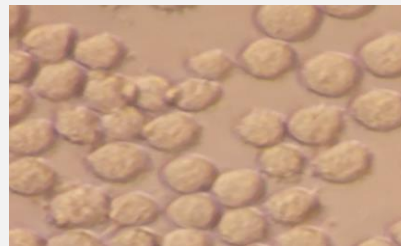
Ένωση 47



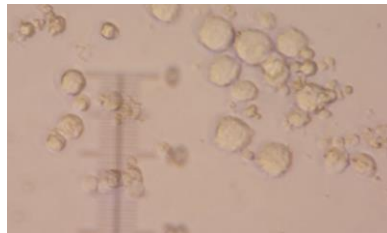
Ένωση 57



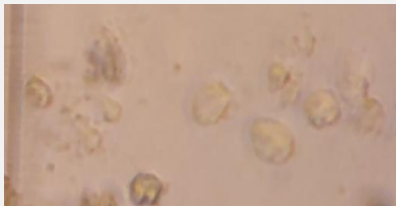
Ένωση 58



Ένωση 61



Ένωση 64



Ένωση 70



Φωτογραφίες 4: Ενδεικτικές εικόνες των κυττάρων μετά από 48h επώαση με την κάθε ένωση. Οι δοκιμές έγιναν με 0.05mM ένωσης.

Βιβλιογραφία

1. Yamamoto, M., Kensler, T. W. & Motohashi, H. The KEAP1-NRF2 system: A thiol-based sensor-effector apparatus for maintaining redox homeostasis. *Physiol. Rev.* **98**, 1169–1203 (2018).
2. Sies, H. *Oxidative Stress*. (Harcourt Brace Jovanovich, 1985).
3. Sies, H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* **4**, 180–183 (2015).
4. Sies, H. Oxidative stress: Concept and some practical aspects. *Antioxidants* **9**, 1–6 (2020).
5. Pisoschi, A. M. & Pop, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.* **97**, 55–74 (2015).
6. Sies, H., Berndt, C. & Jones, D. P. Oxidative Stress. *Annu. Rev. Biochem.* 716–748 (2017).
7. Karich, A., Scheibner, K., Ullrich, R. & Hofrichter, M. Exploring the catalase activity of unspecific peroxygenases and the mechanism of peroxide-dependent heme destruction. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **134**, 238–246 (2016).
8. He, Z. & Simon, H. A novel link between p53 and ROS. *Cell Cycle* **12**, 201–206 (2013).
9. Chao, M. R. *et al.* Biomarkers of nucleic acid oxidation – A summary state-of-the-art. *Redox Biol.* **42**, (2021).
10. Hawkins, C. L. & Davies, M. J. Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications. *J. Biol. Chem.* **294**, 19683–19708 (2019).
11. Gaschler, M. M. & Stockwell, B. R. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **482**, 419–425 (2017).
12. Niki, E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 469–484 (2009).
13. Shen, C. Y. *et al.* The development of maillard reaction, and advanced glycation end product (Age)-receptor for age (rage) signaling inhibitors as novel therapeutic strategies for patients with age-related diseases. *Molecules* **25**, (2020).
14. Lingappan, K. NF-κB in Oxidative Stress. *Curr. Opin. Toxicol.* **7**, 81–86 (2018).
15. Jänicke, R. U., Sohn, D. & Schulze-Osthoff, K. The dark side of a tumor suppressor: Anti-apoptotic p53. *Cell Death Differ.* **15**, 959–976 (2008).
16. Liu, D. & Xu, Y. P53, oxidative stress, and aging. *Antioxidants Redox Signal.* **15**, 1669–1678 (2011).
17. Verma, N., Singh, H., Khanna, D., Rana, P. S. & Bhadada, S. K. Classification of drug molecules for oxidative stress signalling pathway. *IET Syst. Biol.* **13**, 243–250 (2019).
18. Zhang, Q., Bergman, J., Wiman, K. G. & Bykov, V. J. N. Role of Thiol Reactivity for Targeting Mutant p53. *Cell Chem. Biol.* **25**, 1219-1230.e3 (2018).
19. Canning, P., Sorrell, F. J. & Bullock, A. N. Structural basis of Keap1 interactions with Nrf2. *Free Radic.*

- Biol. Med.* **88**, 101–107 (2015).
20. Panieri, E. *et al.* Potential applications of NRF2 modulators in cancer therapy. *Antioxidants* **9**, 1–48 (2020).
 21. He, F., Ru, X. & Wen, T. NRF2, a transcription factor for stress response and beyond. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–23 (2020).
 22. Ooi, B. K., Chan, K. G., Goh, B. H. & Yap, W. H. The Role of Natural Products in Targeting Cardiovascular Diseases via Nrf2 Pathway: Novel Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Front. Pharmacol.* **9**, 1–18 (2018).
 23. Georgiou-Siafis, S. K. & Tsiftoglou, A. S. Activation of KEAP1/NRF2 stress signaling involved in the molecular basis of hemin-induced cytotoxicity in human pro-erythroid K562 cells. *Biochem. Pharmacol.* **175**, 113900 (2020).
 24. Franklin, C. C. *et al.* Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Mol. Aspects Med.* **30**, 86–98 (2009).
 25. Song, M. Y., Lee, D. Y., Chun, K. S. & Kim, E. H. The role of nrf2/keap1 signaling pathway in cancer metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–16 (2021).
 26. Mushtaq, S., Abbasi, B. H., Uzair, B. & Abbasi, R. Natural products as reservoirs of novel therapeutic agents. *EXCLI J.* **17**, 420–451 (2018).
 27. Cruceriu, D., Balacescu, O. & Rakosy, E. *Calendula officinalis*: Potential Roles in Cancer Treatment and Palliative Care. *Integr. Cancer Ther.* **17**, 1068–1078 (2018).
 28. Qin, J. J., Wang, W. & Zhang, R. Novel natural product therapeutics targeting both inflammation and cancer. *Chin. J. Nat. Med.* **15**, 401–416 (2017).
 29. Saleem, S., Muhammad, G., Hussain, M. A., Altaf, M. & Abbas Bukhari, S. N. *Withania somnifera* L.: Insights into the phytochemical profile, therapeutic potential, clinical trials, and future prospective. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **23**, 1501–1526 (2020).
 30. Logie, E. & Berghe, W. Vanden. Tackling chronic inflammation with withanolide phytochemicals—a withaferin a perspective. *Antioxidants* **9**, 1–16 (2020).
 31. Ajit, D. *et al.* Phytochemicals and botanical extracts regulate NF- κ B and Nrf2/ARE reporter activities in di TNC1 astrocytes. *Neurochem. Int.* **97**, 49–56 (2016).
 32. Miran, M. *et al.* Taxonomical Investigation, Chemical Composition, Traditional Use in Medicine, and Pharmacological Activities of *Boswellia sacra* Flueck. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2022**, (2022).
 33. Roy, N. K. *et al.* An update on pharmacological potential of boswellic acids against chronic diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
 34. Suhail, M. M. *et al.* *Boswellia sacra* essential oil induces tumor cell-specific apoptosis and suppresses tumor aggressiveness in cultured human breast cancer cells. *BMC Complement. Altern. Med.* **11**, 129 (2011).

35. Khazaei, R., Seidavi, A. & Bouyeh, M. A review on the mechanisms of the effect of silymarin in milk thistle (*Silybum marianum*) on some laboratory animals. *Vet. Med. Sci.* **8**, 289–301 (2022).
36. Shaker, E., Mahmoud, H. & Mnaa, S. Silymarin, the antioxidant component and *Silybum marianum* extracts prevent liver damage. *Food Chem. Toxicol.* **48**, 803–806 (2010).
37. Taleb, A. *et al.* Antioxidant effects and mechanism of silymarin in oxidative stress induced cardiovascular diseases. *Biomed. Pharmacother.* **102**, 689–698 (2018).
38. Abenavoli, L., Capasso, R., Milic, N. & Capasso, F. Milk Thistle in Liver Diseases: Past, Present, Future. *Phyther. Res.* **24**, 1423–1432 (2010).
39. Yassin, N. Y. S. *et al.* *Silybum marianum* total extract, silymarin and silibinin abate hepatocarcinogenesis and hepatocellular carcinoma growth via modulation of the HGF/c-Met, Wnt/ β -catenin, and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways. *Biomed. Pharmacother.* **145**, 112409 (2022).
40. Nowak, A. *et al.* The Effects of Extraction Techniques on the Antioxidant Potential of Extracts of Different Parts of Milk Thistle (*Silybum Marianum* L.). *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* **20**, 37–46 (2021).
41. Oliveira, J. R. De, Esteves, S. & Camargo, A. *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) as therapeutic and prophylactic agent. *J. Biomed. Sci.* **8**, 1–22 (2019).
42. Antoniou, C. & Hull, J. The Anti-cancer Effect of *Olea europaea* L. Products: a Review. *Curr. Nutr. Rep.* 99–124 (2021) doi:10.1007/s13668-021-00350-8.
43. ALHaithloul, H. A. S., Alotaibi, M. F., Bin-Jumah, M., Elgebaly, H. & Mahmoud, A. M. *Olea europaea* leaf extract up-regulates Nrf2/ARE/HO-1 signaling and attenuates cyclophosphamide-induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in rat kidney. *Biomed. Pharmacother.* **111**, 676–685 (2019).
44. Paduch, R., Woźniak, A., Niedziela, P. & Rejdak, R. Assessment of eyebright (*Euphrasia officinalis* L.) extract activity in relation to human corneal cells using in vitro tests. *Balkan Med. J.* **31**, 29–36 (2014).
45. Liu, Y. *et al.* Protective effects of *euphrasia officinalis* extract against ultraviolet b-induced photoaging in normal human dermal fibroblasts. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
46. Patil, S. M., Ramu, R., Shirahatti, P. S., Shivamallu, C. & Amachawadi, R. G. A systematic review on ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacological aspects of *Thymus vulgaris* Linn. *Heliyon* **7**, e07054 (2021).
47. Sun, Z. *et al.* *Thymus vulgaris* alleviates UVB irradiation induced skin damage via inhibition of MAPK/AP-1 and activation of Nrf2-ARE antioxidant system. *J. Cell. Mol. Med.* **21**, 336–348 (2017).
48. Zhang, W. *et al.* Rosmarinic acid prevents refractory bacterial pneumonia through regulating Keap1/Nrf2-mediated autophagic pathway and mitochondrial oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **168**, 247–257 (2021).
49. Mitropoulou, G. *et al.* Assessment of the antimicrobial, antioxidant, and antiproliferative potential

- of sideritis raeseri subsp. raeseri essential oil. *Foods* **9**, (2020).
50. Li, H., Qin, T., Li, M. & Ma, S. Thymol improves high-fat diet-induced cognitive deficits in mice via ameliorating brain insulin resistance and upregulating NRF2/HO-1 pathway. *Metab. Brain Dis.* **32**, 385–393 (2017).
 51. Naeem, K. *et al.* Natural dietary supplement, carvacrol, alleviates LPS-induced oxidative stress, neurodegeneration, and depressive-like behaviors via the Nrf2/Ho-1 pathway. *J. Inflamm. Res.* **14**, 1313–1329 (2021).
 52. Ayati, Z. *et al.* Phytochemistry, Traditional Uses and Pharmacological Profile of Rose Hip: A Review. *Curr. Pharm. Des.* **24**, 4101–4124 (2018).
 53. González-Mañán, D. *et al.* Rosa mosqueta oil prevents oxidative stress and inflammation through the upregulation of PPAR- α and NRF2 in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *J. Nutr.* **147**, 579–588 (2017).
 54. Kilinc, K. *et al.* Rosa canina Extract has Antiproliferative and Proapoptotic Effects on Human Lung and Prostate Cancer Cells. *Nutr. Cancer* **72**, 273–282 (2020).
 55. Ramappa, V. K. *et al.* Mulberries: A Promising Fruit for Phytochemicals, Nutraceuticals, and Biological Activities. *Int. J. Fruit Sci.* **20**, S1254–S1279 (2020).
 56. Hu, D. *et al.* Polysaccharide from Mulberry Fruit (*Morus alba* L.) Protects against Palmitic-Acid-Induced Hepatocyte Lipotoxicity by Activating the Nrf2/ARE Signaling Pathway. *J. Agric. Food Chem.* **68**, 13016–13024 (2020).
 57. Sailaja, B. S. *et al.* Moringa isothiocyanate-1 regulates Nrf2 and NF- κ B pathway in response to LPS-driven sepsis and inflammation. *PLoS One* **16**, 1–18 (2021).
 58. Duranti, G. *et al.* Moringa oleifera leaf extract upregulates nrf2/ho-1 expression and ameliorates redox status in c2c12 skeletal muscle cells. *Molecules* **26**, (2021).
 59. Cheng, D. *et al.* Moringa isothiocyanate activates Nrf2: potential role in diabetic nephropathy. *Am. Assoc. Pharm. Sci.* **21**, (2020).
 60. Kalogeropoulos, N., Konteles, S. J., Troullidou, E., Mourtzinou, I. & Karathanos, V. T. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chem.* **116**, 452–461 (2009).
 61. Kocot, J., Kiełczykowska, M., Luchowska-Kocot, D., Kurzepa, J. & Musik, I. Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly: Possible medical application. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, (2018).
 62. Hotta, S., Uchiyama, S. & Ichihara, K. Brazilian red propolis extract enhances expression of antioxidant enzyme genes in vitro and in vivo. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **84**, 1820–1830 (2020).
 63. Soltani, S., Shakeri, A., Iranshahi, M. & Boozari, M. A review of the phytochemistry and antimicrobial properties of origanum vulgare L. And subspecies. *Iran. J. Pharm. Res.* **20**, 268–285 (2021).
 64. Zou, Y., Wang, J., Peng, J. & Wei, H. Oregano Essential Oil Induces SOD1 and GSH Expression

- through Nrf2 Activation and Alleviates Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Damage in IPEC-J2 Cells. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, (2016).
65. Kosakowska, O. *et al.* Antioxidant and antibacterial activity of roseroot (*Rhodiola rosea* L.) dry extracts. *Molecules* **23**, 1–14 (2018).
 66. Tang, H. *et al.* Salidroside protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis: activation of Nrf2-antioxidant signaling, and inhibition of NF- κ B and TGF- β 1/Smad-2/-3 pathways. *Cell Stress Chaperones* **21**, 239–249 (2016).
 67. Oliveira, A. I., Pinho, C., Sarmiento, B. & Dias, A. C. P. Neuroprotective activity of hypericum perforatum and its major components. *Front. Plant Sci.* **7**, 1–15 (2016).
 68. Park, J. Y. *et al.* Hyperoside Induces Endogenous Antioxidant System to Alleviate Oxidative Stress. *J. Cancer Prev.* **21**, 41–47 (2016).
 69. Axiotis, E., Petrakis, E. A., Halabalaki, M. & Mitakou, S. Phytochemical Profile and Biological Activity of Endemic *Sideritis siphylea* Boiss. in North Aegean Greek Islands. *Molecules* **25**, 438–440 (2020).
 70. González-Burgos, E., Carretero, M. E. & Gómez-Serranillos, M. P. Nrf2-dependent neuroprotective activity of diterpenoids isolated from *Sideritis* spp. *J. Ethnopharmacol.* **147**, 645–652 (2013).
 71. Żyżelewicz, D., Kulbat-Warycha, K., Oracz, J. & Żyżelewicz, K. Polyphenols and other bioactive compounds of *Sideritis* plants and their potential biological activity. *Molecules* **25**, 1–18 (2020).
 72. Chrysargyris, A. *et al.* Cultivation strategy to improve chemical profile and anti-oxidant activity of *Sideritis perfoliata* L. subsp. *perfoliata*. *Ind. Crops Prod.* **140**, 111694 (2019).
 73. Seo, H. S. *et al.* Apigenin induces apoptosis via extrinsic pathway, inducing p53 and inhibiting STAT3 and NF κ B signaling in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Mol. Cell. Biochem.* **366**, 319–334 (2012).
 74. Mocan, A. *et al.* Chemical constituents and biologic activities of sage species: A comparison between *Salvia officinalis* L., *S. glutinosa* L. and *S. transsylvanica* (Schur ex Griseb. & Schenk) Schur. *Antioxidants* **9**, (2020).
 75. Fishedick, J. T., Standiford, M., Johnson, D. A. & Johnson, J. A. Structure activity relationship of phenolic diterpenes from *Salvia officinalis* as activators of the nuclear factor E2-related factor 2 pathway. *Bioorg. Med. Chem.* **21**, 2618–2622 (2013).
 76. Skaperda, Z. *et al.* In vitro antioxidant properties of herb decoction extracts derived from Epirus, Greece. *Int. J. Funct. Nutr.* **2**, 1–13 (2021).
 77. Sasaki, T. *et al.* Antioxidant lignoids from leaves of *Ribes nigrum*. *Phytochemistry* **95**, 333–340 (2013).
 78. Li, L. *et al.* *Ribes nigrum* L. Prevents UVB-mediated Photoaging in Human Dermal Fibroblasts: Potential Antioxidant and Antiinflammatory Activity. *Photochem. Photobiol.* **94**, 1032–1039 (2018).
 79. Magnavacca, A. *et al.* *Ribes nigrum* leaf extract preferentially inhibits IFN- γ -mediated inflammation in HaCAT keratinocytes. *Molecules* **26**, 1–23 (2021).

80. Catani, M. V., Rinaldi, F., Tullio, V., Gasperi, V. & Savini, I. Comparative analysis of phenolic composition of six commercially available chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) extracts: Potential biological implications. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).
81. Zhou, Y. Study of Conjugate Addition of Curcumin and Chalcone Derivatives. (2011).
82. Amslinger, S. *et al.* Reactivity assessment of chalcones by a kinetic thiol assay. *Org. Biomol. Chem.* **11**, 549–554 (2013).
83. Selvaraju, K. *et al.* Cytotoxic unsaturated electrophilic compounds commonly target the ubiquitin proteasome system. *Sci. Rep.* **9**, 1–17 (2019).
84. Aloum, L., Alefishat, E., Adem, A. & Petroianu, G. Ionone Is More than a Violet's Fragrance: A Review. *Molecules* **25**, 14–18 (2020).
85. Al-Rifai, N. The α -Substitution of Chalcones as a Tool to Modulate the Reactivity and Biological Activity. (Universität Regensburg, 2014).
86. National Center for Biotechnology Information. 'PubChem Compound Summary for CID 638014, beta-Ionone' PubChem. 2022 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/beta-Ionone>.
87. Liu, J. *et al.* Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-g Agonist Rosiglitazone– Induced Apoptosis in Leukemia K562 Cells and Its Mechanisms of Action. *Int. J. Toxicol.* **28**, 123–131 (2009).
88. Advanced Chemistry Development Inc. ACD/ChemSketch Freeware. (2021).
89. 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).
90. National Center for Biotechnology Information. 'PubChem Compound Summary for CID 15911, DPPH radical' PubChem. (2022).
91. Kedare, S. B. & Singh, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J. Food Sci. Technol.* **48**, 412–422 (2011).
92. Murti, Y., Goswami, A. & Mishra, P. Synthesis and antioxidant activity of some chalcones and flavanoids. *Int. J. PharmTech Res.* **5**, 811–818 (2013).
93. Gülçin, I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology* **217**, 213–220 (2006).
94. National Center for Biotechnology Information. 'PubChem Compound Summary for CID 35687, Abts' PubChem,. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Abts>. (2022).
95. Ilyasov, I. R., Beloborodov, V. L., Selivanova, I. A. & Terekhov, R. P. ABTS/PP decolorization assay of antioxidant capacity reaction pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).
96. Nenadis, N., Wang, L. F., Tsimidou, M. & Zhang, H. Y. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS .+ assay. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 4669–4674 (2004).
97. Julianus Sohilait, H. & Kainama, H. Free Radical Scavenging Activity of Essential Oil of *Eugenia caryophyllata* from Amboina Island and Derivatives of Eugenol. *Open Chem.* **17**, 422–428 (2019).

98. Veskoukis, A. S. *et al.* Grape stem extracts from three native Greek vine varieties exhibit strong antioxidant and antimutagenic properties. *Anticancer Res.* **40**, 2025–2032 (2020).
99. Tsiftoglou, A. S., Wong, W., Robinson, S. H. & Hensold, J. Hemin increases production of β -like globin RNA transcripts in human erythroleukemia K-562 cells. *Dev. Genet.* **10**, 311–317 (1989).
100. Balvan, J. *et al.* Multimodal holographic microscopy: Distinction between apoptosis and oncosis. *PLoS One* **10**, (2015).
101. Strober, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr. Protoc. Immunol.* **Appendix 3**, 2–3 (2001).
102. Brisdelli, F. *et al.* Proteomic analysis of quercetin-treated K562 cells. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).
103. PanReac Appllichem. *Bradford - Solution for Protein Determination.* <https://www.itwreagents.com/rest-of-world/en/product/bradford-solution-for-protein-determination/A6932>.
104. AnaSpec Inc. *Caspase 3 (Apopain) Substrate 1, chromogenic.* <https://www.eurogentec.com/assets/11da1eb5-e74d-4522-b798-c98d5530b211/tds-en-as-25263-5-caspase-3-apopain-substrate-1-chromogenic.pdf>.
105. Zepeda, B. & Verdonk, J. C. RNA Extraction from Plant Tissue with Homemade Acid Guanidinium Thiocyanate Phenol Chloroform (AGPC). *Curr. Protoc.* **2**, 1–14 (2022).
106. Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate–Phenol–Chloroform Extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159 (1987).
107. Sikand, K., Singh, J., Ebron, J. S. & Shukla, G. C. Housekeeping Gene Selection Advisory: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) and β -Actin Are Targets of miR-644a. *PLoS One* **7**, 1–9 (2012).
108. Sakasai-Sakai, A., Takeuchi, M. & Takata, T. Intracellular toxic advanced glycation end-products promote the production of reactive oxygen species in HEPG2 cells. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–14 (2020).
109. Yeligar, S. M., Machida, K. & Kalra, V. K. Ethanol-induced HO-1 and NQO1 are differentially regulated by HIF-1 α and Nrf2 to attenuate inflammatory cytokine expression. *J. Biol. Chem.* **285**, 35359–35373 (2010).
110. IBM Corp. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 26.0. Armonk, NY: IBM Corp. (2019).
111. Midway, S., Robertson, M., Flinn, S. & Kaller, M. Comparing multiple comparisons: practical guidance for choosing the best multiple comparisons test. *PeerJ* **8**, 1–26 (2020).
112. GraphPad Software. GraphPad Prism version 8.0.1 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA.
113. Polumackanycz, M., Sledzinski, T., Goyke, E., Wesolowski, M. & Viapiana, A. A comparative study on the phenolic composition and biological activities of morus alba L. Commercial samples. *Molecules* **24**, 1–19 (2019).
114. Upadhyya, V., Pai, S. R. & Hegde, H. V. Effect of method and time of extraction on total phenolic

- content in comparison with antioxidant activities in different parts of *Achyranthes aspera*. *J. King Saud Univ. - Sci.* **27**, 204–208 (2015).
115. Dobrinas, S., Soceanu, A., Popescu, V., Carazeanu Popovici, I. & Jitariu, D. Relationship between total phenolic content, antioxidant capacity, Fe and Cu content from tea plant samples at different brewing times. *Processes* **9**, (2021).
 116. Kim, J.-S. & Lee, J.-H. Correlation between Solid Content and Antioxidant Activities in Umbelliferae Salad Plants. *Prev. Nutr. Food Sci.* **25**, 84–92 (2020).
 117. Syed Salleh, S. N. A. *et al.* Determination of Total Phenolics, Flavonoids, and Antioxidant Activity and GC-MS Analysis of Malaysian Stingless Bee Propolis Water Extracts. *Scientifica (Cairo)*. **2021**, (2021).
 118. Munir, N. *et al.* *Withania somnifera* Chemical Constituents' In Vitro Antioxidant Potential and Their Response on Spermatozoa Parameters. *Dose-Response* **20**, (2022).
 119. Beghelli, D. *et al.* Antioxidant and Ex Vivo Immune System Regulatory Properties of *Boswellia serrata* Extracts. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, (2017).
 120. Gedikoğlu, A., Sökmen, M. & Çivit, A. Evaluation of *Thymus vulgaris* and *Thymbra spicata* essential oils and plant extracts for chemical composition, antioxidant, and antimicrobial properties. *Food Sci. Nutr.* **7**, 1704–1714 (2019).
 121. Chavan, J. J., Gaikwad, N. B., Kshirsagar, P. R. & Dixit, G. B. Total phenolics, flavonoids and antioxidant properties of three *Ceropegia* species from Western Ghats of India. *South African J. Bot.* **88**, 273–277 (2013).
 122. Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I. & Chun, O. K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J. Food Compos. Anal.* **24**, 1043–1048 (2011).
 123. Bale, A. T. *et al.* Chalcones and Bis-Chalcones Analogs as DPPH and ABTS Radical Scavengers. *Lett. Drug Des. Discov.* **18**, 249–257 (2020).
 124. Kachadourian, R. *et al.* A Synthetic Chalcone as a Potent Inducer of Glutathione Biosynthesis. *J. Med. Chem.* **55**, 1–18 (2012).
 125. Wang, H. X., Kolesnikova, T. V., Denison, C., Gygi, S. P. & Hemler, M. E. The C-terminal tail of tetraspanin protein CD9 contributes to its function and molecular organization. *J. Cell Sci.* **124**, 2702–2710 (2011).
 126. Niles, A. L., Moravec, R. A. & Riss, T. L. Caspase activity assays. *Methods Mol. Biol.* **414**, 137–150 (2007).
 127. Yuan, J., Najafov, A. & Py, B. Roles of Caspases in Necrotic Cell Death. *Cell* **167**, 1693–1704 (2016).
 128. Lou, J. *et al.* Caspase-Independent Regulated Necrosis Pathways as Potential Targets in Cancer Management. *Front. Oncol.* **10**, 1–22 (2021).
 129. Liu, Z., Li, X., Simoneau, A. R., Jafari, M. & Zi, X. *Rhodiola rosea* extracts and salidroside decrease the growth of bladder cancer cell lines via inhibition of the mTOR pathway and induction of

- autophagy. *Mol. Carcinog.* **51**, 257–267 (2012).
130. Chiang, H. M., Chen, H. C., Wu, C. S., Wu, P. Y. & Wen, K. C. Rhodiola plants: Chemistry and biological activity. *J. Food Drug Anal.* **23**, 359–369 (2015).
 131. Usuda, J. *et al.* Restoration of p53 gene function in 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-resistant human leukemia K562/TPA cells. *Int. J. Oncol.* **22**, 81–86 (2003).
 132. Khan, F., Pandey, P., Ahmad, V. & Upadhyay, T. K. Moringa oleifera methanolic leaves extract induces apoptosis and G0/G1 cell cycle arrest via downregulation of Hedgehog Signaling Pathway in human prostate PC-3 cancer cells. *J. Food Biochem.* **44**, 1–10 (2020).
 133. Diab, K. A. E., Guru, S. K., Bhushan, S. & Saxena, A. K. In vitro anticancer activities of Anogeissus latifolia, Terminalia bellerica, Acacia catechu and Moringa oleifera Indian plants. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **16**, 6423–6428 (2015).
 134. Kashyap, V. K. *et al.* Withania somnifera: Progress towards a Pharmaceutical Agent for Immunomodulation and Cancer Therapeutics. *Pharmaceutics* **14**, 1–31 (2022).
 135. Mondal, S., Mandal, C., Sangwan, R., Chandra, S. & Mandal, C. Withanolide D induces apoptosis in leukemia by targeting the activation of neutral sphingomyelinase-ceramide cascade mediated by synergistic activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *Mol. Cancer* **9**, (2010).
 136. Okumura, N., Yoshida, H., Nishimura, Y., Kitagishi, Y. & Matsuda, S. Terpinolene, a component of herbal sage, downregulates AKT1 expression in K562 cells. *Oncol. Lett.* **3**, 321–324 (2012).
 137. Lampronti, I., Saab, A. M. & Gambari, R. Antiproliferative activity of essential oils derived from plants belonging to the Magnoliophyta division. *Int. J. Oncol.* **29**, 989–995 (2006).
 138. Afonso, A. F., Pereira, O. R. & Cardoso, S. M. Health-promoting effects of thymus phenolic-rich extracts: Antioxidant, anti-inflammatory and antitumoral properties. *Antioxidants* **9**, 1–24 (2020).
 139. Najar, B., Shortrede, J. E., Pistelli, L. & Buhagiar, J. Chemical Composition and in Vitro Cytotoxic Screening of Sixteen Commercial Essential Oils on Five Cancer Cell Lines. *Chem. Biodivers.* **17**, (2020).
 140. Faezizadeh, Z., Mesbah-Namin, S. A. R. & Allameh, A. The effect of silymarin on telomerase activity in the human leukemia cell line K562. *Planta Med.* **78**, 899–902 (2012).
 141. Samet, I., Han, J., Jlaiel, L., Sayadi, S. & Isoda, H. Olive (*Olea europaea*) leaf extract induces apoptosis and monocyte/macrophage differentiation in human chronic myelogenous leukemia K562 cells: Insight into the underlying mechanism. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, (2014).
 142. Mazzi, E. A. & Soliman, K. F. A. In vitro screening of tumoricidal properties of international medicinal herbs: Part II. *Phyther. Res.* **24**, 1813–1824 (2010).
 143. Ogata-Ikeda, I., Seo, H., Kawanai, T., Hashimoto, E. & Oyama, Y. Cytotoxic action of bisabololoxide A of German chamomile on human leukemia K562 cells in combination with 5-fluorouracil. *Phytomedicine* **18**, 362–365 (2011).
 144. Matic, I. Z. *et al.* Chamomile and marigold tea: Chemical characterization and evaluation of

- anticancer activity. *Phyther. Res.* **27**, 852–858 (2013).
145. Faezizadeh, Z., Gharib, A. & Godarzee, M. Anti-Proliferative and Apoptotic Effects of Beta-Ionone in Human Leukemia Cell Line K562. *Zahedan J. Res. Med. Sci. In Press*, 3–7 (2016).
 146. Skupień, K., Kostrzewa-Nowak, D., Oszmiański, J. & Tarasiuk, J. In Vitro Antileukaemic Activity of Extracts from Chokeberry (*Aronia melanocarpa* [Michx] Elliott) and Mulberry (*Morus alba* L.) Leaves against Sensitive and Multidrug Resistant HL60 Cells. *Phyther. Res.* **22**, 544–549 (2008).
 147. Franchi, G. C. *et al.* Comparison of effects of the ethanolic extracts of brazilian propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT assay. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2012**, (2012).
 148. Fatima, K., Luqman, S. & Meena, A. Carvacrol Arrests the Proliferation of Hypopharyngeal Carcinoma Cells by Suppressing Ornithine Decarboxylase and Hyaluronidase Activities. *Front. Nutr.* **9**, 1–15 (2022).
 149. Kayabasi, C. *et al.* Origanum Sipyleum Methanol Extract in Combination with Ponatinib Shows Synergistic anti-Leukemic Activities on Chronic Myeloid Leukemia Cells. *Nutr Cancer* 1–13 (2022).
 150. Valletta, E., Rinaldi, A., Marini, M., Franzese, O. & Roscetti, G. Distinct Hypericum perforatum L. total extracts exert different antitumour activity on erythroleukemic K562 cells. *Phyther. Res.* **32**, 1803–1811 (2018).
 151. Jia, N., Li, T., Diao, X. & Kong, B. Protective effects of black currant (*Ribes nigrum* L.) extract on hydrogen peroxide-induced damage in lung fibroblast MRC-5 cells in relation to the antioxidant activity. *J. Funct. Foods* **11**, 142–151 (2014).
 152. Safa, M., Jafari, L., Alikarami, F., Shabestari, R. M. & Kazemi, A. Indole-3-carbinol induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells through suppression of STAT5 and Akt signaling pathways. *Tumor Biol.* **39**, (2017).
 153. Romagnoli, R. *et al.* Biological Evaluation of a Series of 2-(3,4,5-Trimethoxybenzoyl)-Indol-3-yl Acetic Acid Derivatives as Potential Agents against Human Leukemia K562 Cells. *Lett. Drug Des. Discov.* **5**, 214–220 (2008).
 154. Zarlaha, A., Kourkoumelis, N., Stanojkovic, T. P. & Kovala-Demertzi, D. Cytotoxic activity of essential oil and extracts of *Ocimum Basilicum* against human carcinoma cells. Molecular docking study of isoeugenol as a potent cox and lox inhibitor. *Dig. J. Nanomater. Biostructures* **9**, 907–917 (2014).
 155. Ma, L., Liu, J., Lin, Q., Gu, Y. & Yu, W. Eugenol protects cells against oxidative stress via Nrf2. *Exp. Ther. Med.* **21**, 1–8 (2020).
 156. Allegra, A., Tonacci, A., Pioggia, G., Musolino, C. & Gangemi, S. Anticancer activity of *rosmarinus officinalis* L.: Mechanisms of action and therapeutic potentials. *Nutrients* **12**, 1–25 (2020).
 157. Dastidar, S. G. *et al.* Glutathione s-transferase p deficiency induces glucose intolerance via jnk-dependent enhancement of hepatic gluconeogenesis. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **315**, E1005–E1018 (2018).

