



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

**ΤΟΜΕΑΣ IV: ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων
από φυτά της ελληνικής χλωρίδας στην
αγγειογένεση**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

ΙΩΑΝΝΑΣ Κ. ΝΑΚΑ

**Επιβλέπων : Φραγκίσκος Κολίσης
Καθηγητής Ε.Μ.Π.**

Αθήνα, Απρίλιος 2014

*Στην μνήμη της πολυαγαπημένης μου μητέρας
και στην οικογένεια μου...*

Ευχαριστίες

Η εκπόνηση της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας πραγματοποιήθηκε στα ερευνητικά εργαστήρια «ΓΠ Λιβανός και Μ Σίμου» της Α' Κλινικής Εντατικής Θεραπείας, Νοσοκομείο Ευαγγελισμός, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών και ήταν μέρος του ερευνητικού προγράμματος "Δράση Εθνικής Εμβέλειας, «ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ» Πράξη ΙΙ «Συνεργατικά Έργα Μεγάλης Κλίμακας, Έργο 09 ΣΥΝ-21-1078: Development of novel angiogenesis-modulating pharmaceuticals by screening of natural compounds and synthetic analogues, 2011-2015".

Η συνεισφορά πολλών ανθρώπων υπήρξε καταλυτική για την επιτυχή περάτωση αυτής της Διπλωματικής Εργασίας και αισθάνομαι ότι πρέπει να εκφράσω την ευγνωμοσύνη και τις ευχαριστίες μου.

Καταρχήν, θερμές ευχαριστίες στον καθηγητή κ. Φραγκίσκο Κολίση για την επίβλεψη αυτής της διπλωματικής εργασίας και για την ευκαιρία που μου έδωσε να την εκπονήσω. Ήταν πάντα διαθέσιμος να μου προσφέρει τις γνώσεις και την εμπειρία του για τη βαθύτερη κατανόηση των διαφόρων πειραματικών μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια του εργαστηρίου και εμμέσως στην εν λόγω διπλωματική εργασία.

Στη συνέχεια, ευχαριστώ ιδιαίτερα τη Δρ. Ελένη Λουτράρη, ερευνήτρια στην Α' Κλινική Εντατικής Θεραπείας, Νοσοκομείο Ευαγγελισμός, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών, για την εξαιρετική συνεργασία που είχαμε, και ελπίζω πραγματικά να συνεχίσουμε να έχουμε στο μέλλον. Μέσα στον τελευταίο χρόνο ήταν πάντα διαθέσιμη να ασχοληθεί με κάθε απορία μου σχετική με ακαδημαϊκά ζητήματα, εντός και εκτός των πλαισίων της παρούσας εργασίας. Την ευχαριστώ θερμά για τις ιδέες που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης αυτής της εργασίας και για όλες τις ερευνητικές συζητήσεις που πραγματοποιήθηκαν μέσα στα πλαίσια της ομάδας μελέτης που η ίδια επέβλεπε.

Έπειτα, δεν θα μπορούσα να μην αναφερθώ στην ανεκτίμητη και εποικοδομητική συνεργασία που είχα με την μεταδιδάκτορα Μαίρη Μιχαηλίδου. Η βοήθεια, οι γνώσεις και η υποστήριξη της όλο αυτό το χρονικό διάστημα, ήταν καταλύτης για την επιτυχή διεκπεραίωση αυτής της εργασίας. Η προθυμία της να βοηθήσει κάθε στιγμή και σε οποιοδήποτε θέμα σχετικό ή μη με την εργασία μου, χωρίς να είναι στα πλαίσια των αρμοδιοτήτων της την καθιστά σημαντικό μέρος της προσπάθειάς μου. Ελπίζω οι σχέσεις μας με το πέρας της ακαδημαϊκής μου ιδιότητας να συνεχίσουν να υφίστανται. Την ευχαριστώ εγκάρδια και της εύχομαι κάθε επιτυχία στο μέλλον. Επίσης, δεν μπορώ να ξεχάσω όλα τα παιδιά στα εργαστήρια της Α' Κλινικής Εντατικής Θεραπείας που με μεδέτηκαν με χαρά στο περιβάλλον τους και με στήριξαν όλο αυτό τον καιρό.

Σε αυτό το σημείο θέλω να αναφέρω ανθρώπους, εκτός του στενού ακαδημαϊκού περιβάλλοντος, που υπήρξαν σημαντικοί πόλοι στη ζωή μου, προσδίδοντας την απαιτούμενη ισορροπία. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους και τις φίλες εντός και εκτός σχολής που έκαναν τα χρόνια αυτά μία πραγματικά αξέχαστη εμπειρία. Βέβαια, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένεια μου, στους γονείς μου, Ειρήνη και Κωνσταντίνο των οποίων η πίστη στις δυνατότητες μου αποτέλεσε αρωγός σε όλους τους στόχους και τα όνειρά μου, και οι οποίοι με ανέθρεψαν σε ένα ειδυλλιακό περιβάλλον χωρίς καμία στέρηση. Ένα μεγάλο ευχαριστώ και στον αδερφό μου Δημήτρη που πάντα ήταν και

θα είναι δίπλα μου και προσφέρει την αγάπη και την αμέριστη στήριξή του σε όλη την πορεία της ζωής μου. Ελπίζω με την συγκεκριμένη διπλωματική εργασία αλλά και με την σταδιοδρομία μου στην σχολή των Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π να έκανα έστω και λίγο περήφανη την μητέρα μου, την οποία έχασα πριν λίγο καιρό και που μέχρι τώρα, ήταν ο φύλακας άγγελος μου στην Γή και τώρα θα είναι στον ουρανό.

Η διπλωματική αυτή εργασία αφιερώνεται στην μονάκριβη μου μητέρα...

Ιωάννα Νάκα

Αθήνα, Απρίλιος 2014

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η φύση είναι μια ανεξάντλητη πηγή χημικών μορίων με σημαντικές βιολογικές ιδιότητες και εντυπωσιακά σε ποικιλία και πρωτοτυπία δομικά χαρακτηριστικά που είναι αδύνατο να προσεγγιστούν από οποιοδήποτε συνθετικό εργαστήριο. Το γεγονός αυτό, καθιστά τα φυσικά προϊόντα εξαιρετικά ενδιαφέροντα από ερευνητικής σκοπιάς για την ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών προϊόντων.

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί ένα πολύ μικρό βήμα προς την κατεύθυνση αυτή. Αντικείμενο της αποτέλεσε ο συστηματικός έλεγχος 111 επιμέρους κλασμάτων δραστικών εκχυλισμάτων, τα οποία έχουν απομονωθεί από φυτά της ελληνικής χλωρίδας, σχετικά με την ικανότητά τους να αναστέλλουν ή να επάγουν την αγγειογένεση. Η βιολογική αυτή διαδικασία ορίζεται ως ο σχηματισμός νέων αγγείων από ήδη υπάρχοντα, και λόγω της εμπλοκής σε πολλά νοσήματα και ειδικά στον καρκίνο, υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη ενώσεων που μπορούν να την επηρεάζουν.

Τα εξεταζόμενα κλάσματα προήλθαν από εκχυλίσματα φυτών που ευδοκίμούν στην Ελλάδα (*Asphodeline lutea*, *Glycyrrhiza glabra*, *Nepeta orphanidea* var. *Parnidea*, *Onobrychis ebenoides*, *Salvia argentea*, *Amelanchier parviflora* subsp. *Chelmea*, *Daphne oleoides*, *Inula pseudolimonella*, *Bupleurum fruticosum*, *Laserpitium pseudomeum*), είναι άγνωστα για το ευρύ κοινό και το μεγαλύτερο μέρος τους εξετάζεται για πρώτη φορά.

Στην εργασία αυτή, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα αυτού του ελέγχου σε ένα πειραματικό *in vitro* μοντέλο προσομοίωσης της ανάπτυξης της δομικής μονάδας των αγγειακών τοιχωμάτων, τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Στην εν λόγω μελέτη χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926 τα οποία παρουσιάζουν λειτουργικά χαρακτηριστικά διαφοροποιημένων ενδοθηλιακών κυττάρων και θεωρούνται κατάλληλα πειραματικά μοντέλα στον προσδιορισμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Οι υπό μελέτη ουσίες προστέθηκαν σε καλλιέργειες EA.hy926 κατά την εκθετική φάση ανάπτυξής τους και στη συνέχεια, ελέγχθηκε η ικανότητά τους να μεταβάλλουν τον ρυθμό πολλαπλασιασμού ή/και τη βιωσιμότητα των κυττάρων, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide].

Τα κλάσματα που παρουσίασαν δραστικότητα, κατατάχτηκαν βάσει της ικανότητάς τους να επηρεάζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε τέσσερις κατηγορίες: 1) ουσίες με ανασταλτική δράση, 2) ουσίες με κυτταροτοξική δράση 3) ουσίες με επαγωγική δράση και 4) ουσίες με μη σημαντική επίδραση. Βρέθηκε ότι πάνω από το 50% των κλαμάτων παρουσίασαν ανασταλτική δράση στον EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ενδεχομένως να έχουν αντι-αγγειογενετική δράση. Επίσης, αξιοσημείωτο είναι ότι ένα μεγάλο ποσοστό των κλασμάτων αυτής της κατηγορίας προκαλούν μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού κατά το ήμισυ σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα, αποτέλεσμα το οποίο, είναι πολύ ενθαρρυντικό για μετέπειτα μελέτες προσδιορισμού μεμονωμένων ενώσεων με αντι-αγγειογενετική δράση. Επιπλέον, βρέθηκε ότι περίπου το 10% των εξεταζόμενων κλασμάτων είχαν επαγωγική δράση στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό επομένως πιθανά να προάγουν την αγγειογένεση. Τέλος, τα υπόλοιπα κλάσματα είτε εμφάνισαν υψηλή κυτταροτοξική δράση, είτε δεν είχαν κάποια σημαντική επίδραση στην αγγειογένεση και συνεπώς δεν παρουσιάζουν περαιτέρω ερευνητικό ενδιαφέρον.

Στο δεύτερο σκέλος της πειραματικής διαδικασίας, διερευνήθηκε η επίδραση καθαρών ενώσεων (Κερκετίνη, Γαλλικό άλας της επιγαλλοκατεχίνης (EGCG), Εριοδικτυόλη, Φισετίνη,

Κουρκουμίνη, Περιλλύλ αλκοόλη (ΡΟΗ), Ναρινγενίνη) προερχόμενων από φυσικά προϊόντα, στην αγγειογένεση. Η διαδικασία αυτή, επιτεύχθηκε προσδιορίζοντας την συγκέντρωση του εκκρινόμενου αυξητικού παράγοντα του ενδοθηλίου (VEGF) σε υπερκείμενα καρκινικών κυττάρων της σειράς ανθρώπινου ηπατοκαρκινώματος (Hep3B) μέσω της μη ανταγωνιστικής μέθοδου ELISA. Το VEGF παίζει πρωταγωνιστικό ρόλο στην διαδικασία της αγγειογένεσης και θεωρείται ένας κρίσιμος ρυθμιστής της αγγειακής ανάπτυξης, επομένως μια ενδεχόμενη μεταβολή στα επίπεδα έκκρισης του υποδηλώνει μια επίδραση στην αγγειογένεση. Βρέθηκε ότι μόνο οι φυσικές ενώσεις EGCG, Φισετίνη και Ναρινγκενίνη μείωσαν σημαντικά τα επίπεδα έκκρισης του VEGF στο υπερκείμενο κυττάρων Hep3B, συνεπώς οι ενώσεις αυτές ενδέχεται να αναστέλλουν και την επαγόμενη από τα καρκινικά κύτταρα Hep3B αγγειογένεση.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Φυσικά φυτικά προϊόντα, δευτερογενείς μεταβολίτες, αγγειογένεση, ενδοθηλιακά κύτταρα, κυτταρική σειρά EA.hy926, VEGF, μέθοδος MTT, μέθοδος ELISA

ABSTRACT

Nature is an inexhaustible source of chemical molecules with important biological properties and an impressive variety and originality of structural characteristics, that cannot be accessed (approached) by any synthetic laboratory. This fact, makes natural products extremely interesting candidates for the development of new pharmaceutical products.

The aim of the present diploma thesis was the systematic screening of a series of 111 partial fractions of bioactive extracts, which have been isolated from plants of Greek flora, for their ability to inhibit or induce the process of angiogenesis. This complex biological process, defined as the generation of new blood vessels from pre-existing ones is involved in many diseases, including cancer. Therefore, there is an intense interest in developing compounds that can be used as angiogenesis modulators. Test fractions were derived from extracts of plants that flourish in Greece (*Asphodeline lutea*, *Glycyrrhiza glabra*, *Nepeta orphanidea* var. *Parnidea*, *Onobrychis ebenoides*, *Salvia argentea*, *Amelanchier parviflora* subsp. *Chelmea*, *Daphne oleoides*, *Inula pseudolimonella*, *Bupleurum fruticosum*, *Laserpitium pseudomeum*). Most of these plants are unknown to the general public and their extracts are currently tested for the first time.

The screening was performed using an experimental in vitro model simulating a very basic pro-angiogenic function, the proliferation of endothelial cells which are the structural units of vessel walls. We used the endothelial cell line EA.hy 926, which has functional characteristics of differentiated endothelial cells and consequently is considered as a suitable experimental model for the determination of endothelial cell proliferation. The examined substances were added to EA.hy926 cells grown at exponential phase and then their ability to alter the rate of cell proliferation and/or cell viability was determined using an MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay.

The fractions that showed effectiveness were classified based on their ability to modulate cell proliferation, into four categories: 1) fractions with inhibitory activity 2) fractions with cytotoxic activity 3) fractions with inducing activity 4) fractions with a non-significant activity. It was found that over 50% of fractions exhibited an inhibitory effect on EA.hy926 cell proliferation and thus may have anti-angiogenic action. A remarkable finding is that a large percentage of fractions belonging to this category, caused a 50% reduction in cell proliferation compared to vehicle control. This result is very encouraging for subsequent studies aiming to identify individual components with anti-angiogenic action. Moreover, it was found that approximately 10% of examined fractions had an inducing effect on cell proliferation, so they probably could stimulate angiogenesis. Finally, the remaining fractions were either ineffective or showed high cytotoxicity, so they do not merit research interest.

In the second part of the present thesis we investigated the effect of various isolated pure plant compounds, namely quercetin, (-)-epigallocatechin gallate, eriodictyol, fisetin, curcuminperillyl alcohol and naringenin on cancer-related angiogenesis. This was accomplished by determining the ability of test agents to modify the levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) that was secreted by treated human hepatocarcinomas Hep3B cells using a non-competitive ELISA method. Since VEGF plays a leading role in the process of angiogenesis and is a critical regulator of vascular development, a potential change of its expression by HEP3B cells could significantly affect angiogenesis. Among test compounds, it was found that (-)-epigallocatechin gallate, fisetin and naringenin,

significantly reduced the levels of VEGF in the supernatant of treated Hep3B cells, thus these compounds may be potential inhibitors of Hep3B-induced angiogenesis.

KEY WORDS: Natural herbal compound, secondary metabolites, angiogenesis, endothelial cells, cell line EA.hy926, VEGF, MTT method, ELISA method.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι.....	1
1 ΦΥΣΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ	1
1.1 Γενικές πληροφορίες.....	1
1.2 Φυσικά προϊόντα από φυτικές πηγές	2
1.3 Χαρακτηριστικές ενώσεις φυτικών προϊόντων.....	2
1.3.1 Φαινολικές ενώσεις	3
1.3.2 Τερπένια	10
1.3.3 Αζωτούχες ενώσεις.....	11
1.3.4 Βιολογική δράση δευτερογενών μεταβολιτών.....	14
2 ΦΥΤΑ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΧΛΩΡΙΔΑΣ ΩΣ ΠΗΓΕΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ	16
3 ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΕΣ ΦΥΣΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ.....	33
4 ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ.....	35
4.1 Γενικές πληροφορίες για την αγγειογένεση.....	35
4.2 Είδη αγγειογένεσης - Angiogenesis	35
4.3 Η αγγειογενετική διαδικασία.....	36
4.4 Αγγειογένεση και ασθένειες που σχετίζονται με αυτήν.....	37
4.4.1 Αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου (VEGF).....	37
4.4.2 Ασθένειες που σχετίζονται με την αγγειογένεση.....	37
4.5 Αγγειογένεση σαν θεραπευτικός στόχος.....	38
4.5.1 Συστήματα μελέτης της αγγειογένεσης	39
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ.....	41
5 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	41
5.1 Αντιδραστήρια, όργανα και αναλόσιμα	41
5.2 Κλάσματα εκχυλισμάτων φυτικής προέλευσης και καθαρές φυσικές ενώσεις.....	43
5.2.1 Μεθοδολογία επεξεργασίας κλασμάτων φυτικής προέλευσης	44
5.3 Κυτταρικές σειρές	44
5.4 Κυτταρικές καλλιέργειες	44
5.5 Ανακαλλιέργεια κυττάρων	45
5.6 Μέτρηση κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer	45
5.6.1 Παράδειγμα υπολογισμού αριθμού κυττάρων	47

5.7	Κατάψυξη κυττάρων	47
5.8	Απόψυξη κυττάρων	48
5.9	Προσδιορισμός κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη μέθοδο MTT (MTT assay).....	48
5.9.1	Δημιουργία πρότυπης καμπύλης.....	50
5.10	Starvation	51
5.11	Η μέθοδος ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).....	51
5.12	Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.....	53
6	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	54
6.1	Μελέτη της επίδρασης φυτικών κλασμάτων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων Παρουσίαση και συζήτηση αποτελεσμάτων της μεθόδου MTT..	54
6.1.1	Κατηγοριοποίηση εξεταζόμενων κλασμάτων ANGF.....	71
6.2	Επίδραση καθαρών φυτικών ενώσεων στην έκκριση του VEGF από καρκινικά κύτταρα Hep3B	78
7	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.....	80
7.1	Συμπεράσματα.....	80
7.2	Προοπτικές.....	81

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ & ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Εικόνα 2.1 Εικόνα <i>Ashpodeline lutea</i>	17
Εικόνα 2.2 <i>Glycyrrhiza glabra</i>	19
Εικόνα 2.3 <i>Nepeta orphanidea</i>	21
Εικόνα 2.4 <i>Onobrychis ebenoides</i>	22
Εικόνα 2.5 <i>Salvia argentea</i>	23
Εικόνα 2.6 <i>Amelanchier parviflora</i>	24
Εικόνα 2.7 <i>Daphne oleoides</i>	26
Εικόνα 2.8 <i>Inula pseudolimonella</i>	28
Εικόνα 2.9 Το <i>Bupleurum fruticosum</i>	30
Εικόνα 2.10 <i>Laserpitium pseudomeum</i>	31
Εικόνα 4.1 Σχηματική αναπαράσταση της νεοαγγειογένεσης, της δημιουργίας του αρχικού αγγειακού δικτύου και της αγγειογένεσης, δηλαδή της δημιουργίας νέων αγγείων από προϋπάρχοντα. Στη νεοαγγειογένεση, αγγειοβλαστικά αρχέγονα κύτταρα στα νεοσχηματιζόμενα όργανα, όπου βρίσκονται ως νησίδες, αναπτύσσονται σε ενδοθηλιακά και αιματοποιητικά κύτταρα. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα θα σχηματίσουν το πρόδρομο αγγειακό πλέγμα, το οποίο αναπτύσσεται και διαφοροποιείται περαιτέρω προκειμένου να σχηματίσει το ώριμο αγγειακό σύστημα. Η αγγειογένεση είναι δυνατόν να διακριθεί σε μια σειρά από διακριτές διαδικασίες.	35
Εικόνα 4.2 Τα διάφορα στάδια της αγγειογένεσης. Αγγειογενετικοί παράγοντες που απελευθερώνονται από τους παρακείμενους ιστούς (1,2) ενεργοποιούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα (3,4) επάγοντας τον πολλαπλασιασμό (5) και τη μετανάστευση τους (6). Κατά την αναδιοργάνωση του εξωκυττάριου στρώματος σχηματίζονται πρώιμα αγγεία (7,8) τα οποία ενώνονται με τα προϋπάρχοντα αγγεία (9) και σταθεροποιούν τη δομή τους με την υποστήριξη άλλων κυττάρων (10).	36
Εικόνα 4.3 Αγγειογένεση σε περιβάλλον κακοήθειας.....	38
Εικόνα 5.1 Αιμακυτταρόμετρο Neubauer. Παρουσιάζεται σχηματικά ο τρόπος υπολογισμού του αριθμού των κυττάρων.	46
Εικόνα 5.2 Αιμακυτταρόμετρο, μετρητής(αριστερά) και Trypan blue (δεξιά).....	47
Εικόνα 5.3 Πλάκα 96 φρεατίων πριν την φωτομέρηση.....	51
Εικόνα 5.4 Παράδειγμα πρότυπης καμπύλης για τον ποσοτικό προσδιορισμό του δείγματος. Στον άξονα y αναπαρίστανται οι απορροφήσεις πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης και στον άξονα x η συγκέντρωσή τους. Ενώνοντας τα σημεία προκύπτει η πρότυπη καμπύλη. Από την τιμή απορρόφησης του εκάστοτε δείγματος που λαμβάνεται στο τέλος της ELISA, μέσω της πρότυπης καμπύλης, υπολογίζεται η συγκέντρωση π.χ. του παράγοντα VEGF.	52
Εικόνα 5.5 Παρουσιάζονται αναλυτικά τα στάδια της μη ανταγωνιστικής μεθόδου ELISA (sandwich).....	53

Σχήμα 1.1	Σχηματική αναπαράσταση προνομιακής δομής.....	1
Σχήμα 1.2	Κατηγοριοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών.....	3
Σχήμα 1.3	Κατηγοριοποίηση πολυφαινολοκών ενώσεων	4
Σχήμα 1.4	Βασικές δομές της τοκοτριενόλης και της α- τοκοφερόλης.....	4
Σχήμα 1.5	Βασικές δομές του βενζοϊκού ,φαινυλοξικού και κινναμωμικού οξέος.....	5
Σχήμα 1.6	Βασική δομή και σύστημα αρίθμησης των φλαβονοειδών.....	6
Σχήμα 1.7	Κατηγοριοποίηση φλαβονοειδή.....	6
Σχήμα 1.8	Βασική δομή αωθοκυάνης.....	7
Σχήμα 1.9	Βασικές δομές Φλαβόνων - Φλαβονόλων.....	7
Σχήμα 1.10	Βασική δομή ισοφλαβονών.....	7
Σχήμα 1.11	Βασική δομή ξανθονών	8
Σχήμα 1.12	Γενική δομή των χαλκονών και των ωρονών	8
Σχήμα 1.13	Βασική δομή στυλβενίων.....	8
Σχήμα 1.14	Δομή της ρεσβερατρόλης.....	9
Σχήμα 1.15	Βασική δομή λιγνάνων.....	9
Σχήμα 1.16	Δομές των δυο κύριων φυτο-λιγνάνων	9
Σχήμα 1.17	Δομή ισοπρενίου.....	10
Σχήμα 1.18	Κατηγοριοποίηση Τερπενοειδών.....	10
Σχήμα 1.19	Δομές χαρακτηριστικών παραδειγμάτων αλκαλοειδών.....	12
Σχήμα 1.20	Βασικές δομές μερικών από των χαρακτηριστικών παραδειγμάτων κυανογόνων γλυκοσιδίων και θειογλυκοζιτών	12
Σχήμα 1.21	Βασικές δομές μερικών από των χαρακτηριστικών παραδειγμάτων μη πρωτεϊνικών αμινοξέων	13
Σχήμα 1.22	Βασική δομή μπετανίνης.....	13
Σχήμα 1.23	Βασική δομή αμινών.....	13
Σχήμα 5.1	Φυτά της ελληνικής χλωρίδας από τα οποία προέρχονται τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα.	43
Σχήμα 5.2	Εξεταζόμενες φυσικές ενώσεις.....	43
Σχήμα 5.3	Αντίδραση αναγωγής του κίτρινου άλατος τετραζολίου (MTT) σε πορφυρού χρώματος κρυστάλλους φορμαζάνη από το ένζυμο ρεδοκτάση	49
Σχήμα 5.4	Σχηματική παράσταση της μεθόδου MTT	50
Σχήμα 6.1	Κατηγοριοποίηση των εξεταζόμενων κλασμάτων ANGF	76

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 6.1	Πρότυπη καμπύλη αναφοράς.....	55
Διάγραμμα 6.2	Επίδραση των κλασμάτων ANGF (24-35) και του εκχυλίσματος 12A από το οποίο προέρχονται τα εξής κλάσματα, στον αριθμό στον EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα κύτταρα επώαστηκαν με ANGF ουσίες (συγκέντρωση 2μg/mL και 20 μg/mL) για 48 ώρες προτού εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. Οι αριθμοί των κυττάρων παρουσιάζονται ως % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 σε σχέση με τον μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± SEM.....	57

Διάγραμμα 6.3 Επίδραση των κλασμάτων ANGF (13-22) και του εκχυλίσματος 34 A από το οποίο προέρχονται τα εξής κλάσματα, στον αριθμό στον EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα κύτταρα επώαστηκαν με ANGF ουσίες (συγκέντρωση 2μg/ml και 20 μg/ml) για 48 ώρες προτού εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. Οι αριθμοί των κυττάρων παρουσιάζονται ως % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 σε σχέση με τον μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± SEM.....59

Διάγραμμα 6.4 Επίδραση των κλασμάτων ANGF (24-35) και του εκχυλίσματος 13 A από το οποίο προέρχονται τα εξής κλάσματα, στον αριθμό στον EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα κύτταρα επώαστηκαν με ANGF ουσίες (συγκέντρωση 2μg/ml και 20 μg/ml) για 48 ώρες προτού εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. Οι αριθμοί των κυττάρων παρουσιάζονται ως % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 σε σχέση με τον μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± SEM.....60

Διάγραμμα 6.5 Επίδραση των κλασμάτων ANGF (36-46) και του εκχυλίσματος 32 A από το οποίο προέρχονται τα εξής κλάσματα, στον αριθμό στον EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα κύτταρα επώαστηκαν με ANGF ουσίες (συγκέντρωση 2μg/ml και 20 μg/ml) για 48 ώρες προτού εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. Οι αριθμοί των κυττάρων παρουσιάζονται ως % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 σε σχέση με τον μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± SEM.....62

Διάγραμμα 6.6 Επίδραση των κλασμάτων ANGF (47-58) και του εκχυλίσματος 2 A από το οποίο προέρχονται τα εξής κλάσματα, στον αριθμό στον EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα κύτταρα επώαστηκαν με ANGF ουσίες (συγκέντρωση 2μg/ml και 20 μg/ml) για 48 ώρες προτού εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. Οι αριθμοί των κυττάρων παρουσιάζονται ως % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 σε σχέση με τον μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± SEM.....64

Διάγραμμα 6.7 Επίδραση των κλασμάτων ANGF (59-68) και του εκχυλίσματος 9 A από το οποίο προέρχονται τα εξής κλάσματα, στον αριθμό στον EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα κύτταρα επώαστηκαν με ANGF ουσίες (συγκέντρωση 2μg/ml και 20 μg/ml) για 48 ώρες προτού εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. Οι αριθμοί των κυττάρων παρουσιάζονται ως % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 σε σχέση με τον μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± SEM.....65

Διάγραμμα 6.8 Επίδραση των κλασμάτων ANGF (69-78) και του εκχυλίσματος 16 A από το οποίο προέρχονται τα εξής κλάσματα, στον αριθμό στον EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα κύτταρα επώαστηκαν με ANGF ουσίες (συγκέντρωση 2μg/ml και 20 μg/ml) για 48 ώρες προτού εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. Οι αριθμοί των κυττάρων παρουσιάζονται ως % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 σε σχέση με τον μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± SEM.....67

Διάγραμμα 6.9 Επίδραση των κλασμάτων ANGF (79-88) και του εκχυλίσματος 147 A από το οποίο προέρχονται τα εξής κλάσματα, στον αριθμό στον EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα κύτταρα επώαστηκαν με ANGF

ουσίες (συγκέντρωση 2μg/ml και 20 μg/ml) για 48 ώρες προτού εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. Οι αριθμοί των κυττάρων παρουσιάζονται ως % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 σε σχέση με τον μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± SEM.....	68
Διάγραμμα 6.10 Επίδραση των κλασμάτων ANGF (89-98) και του εκχυλίσματος 152 A από το οποίο προέρχονται τα εξής κλάσματα, στον αριθμό στον EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα κύτταρα επωάστηκαν με ANGF ουσίες (συγκέντρωση 2μg/ml και 20 μg/ml) για 48 ώρες προτού εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. Οι αριθμοί των κυττάρων παρουσιάζονται ως % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 σε σχέση με τον μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± SEM.....	69
Διάγραμμα 6.11 Επίδραση των κλασμάτων ANGF (99-113) και του εκχυλίσματος 27 A από το οποίο προέρχονται τα εξής κλάσματα, στον αριθμό στον EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα κύτταρα επωάστηκαν με ANGF ουσίες (συγκέντρωση 2μg/ml και 20 μg/ml) για 48 ώρες προτού εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. Οι αριθμοί των κυττάρων παρουσιάζονται ως % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 σε σχέση με τον μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± SEM.....	71
Διάγραμμα 6.12 Ουσίες ANGF με ανασταλτική δράση στον EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα κύτταρα επωάστηκαν με ANGF ουσίες (συγκέντρωση 2μg/ml και 20 μg/ml) για 48 ώρες προτού εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. Οι αριθμοί των κυττάρων παρουσιάζονται ως % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα . *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± SEM..	73
Διάγραμμα 6.13 Ουσίες ANGF με κυτταροτοξική δράση στον EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα κύτταρα επωάστηκαν με ANGF ουσίες (συγκέντρωση 2μg/ml και 20 μg/ml) για 48 ώρες προτού εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. Οι αριθμοί των κυττάρων παρουσιάζονται ως % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± SEM .	74
Διάγραμμα 6.14 Ουσίες ANGF με επαγωγική δράση στον EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα κύτταρα επωάστηκαν με ANGF ουσίες (συγκέντρωση 2μg/ml και 20 μg/ml) για 48 ώρες προτού εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. Οι αριθμοί των κυττάρων παρουσιάζονται ως % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± SEM .	75
Διάγραμμα 6.15 Ποσοστιαία κατηγοριοποίηση της δράσης των εξεταζόμενων κλασμάτων .	77
Διάγραμμα 6.16 Παράδειγμα πρότυπης καμπύλης για τον ποσοτικό προσδιορισμό του δείγματος.	78
Διάγραμμα 6.17 Επίδραση φυσικών ενώσεων στα επίπεδα εκκρινόμενου VEGF, στα υπερκείμενα κυττάρων Her3B, συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Οι συγκεντρώσεις εκκρινόμενου VEGF παρουσιάζονται ως επί τοις % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα. *P<0.05 σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± SEM.....	79

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2.1 Συμβολισμός μελετώμενων κλασμάτων, ονομασίες των συγκεκριμένων φυτών αλλά και η οικογένεια στην οποία ανήκουν.....	16
Πίνακας 3.1 Κυριότερα χαρακτηριστικά εξεταζόμενων φυσικών ενώσεων	33
Πίνακας 4.1 Παρουσίαση αναστολέων και επαγωγέων της αγγειογένεσης.....	37
Πίνακας 5.1 Αντιδραστήρια, εταιρείες παραγωγής και οι έδρες τους.....	41
Πίνακας 5.2 Χρησιμοποιούμενα όργανα , εταιρείες παραγωγής και οι έδρες τους.....	42
Πίνακας 5.3 Χρησιμοποιούμενα αναλώσιμα, εταιρείες παραγωγής και οι έδρες τους.....	42
Πίνακας 6.1 Ζεύγη τιμών οπτικής πυκνότητας πρότυπων δειγμάτων με γνωστό αριθμό κυττάρων και ο αριθμός αυτός (0-20.000 κύτταρα ανά φρεάτιο).....	54
Πίνακας 6.2 Επίδραση των κλασμάτων ANGF (1-12) και του εκχυλίσματος 12A από το οποίο προέρχονται στον αριθμό των ενδοθηλιακών κυττάρων συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα.....	56
Πίνακας 6.3 Επίδραση των κλασμάτων ANGF (13-22) και του εκχυλίσματος 34A από το οποίο προέρχονται στον αριθμό των ενδοθηλιακών κυττάρων συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα.....	58
Πίνακας 6.4 Επίδραση των κλασμάτων ANGF (24-35) και του εκχυλίσματος 34A από το οποίο προέρχονται, στον αριθμό των ενδοθηλιακών κυττάρων συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα.....	59
Πίνακας 6.5 Επίδραση των κλασμάτων ANGF (36-46) και του εκχυλίσματος 32A από το οποίο προέρχονται, στον αριθμό των ενδοθηλιακών κυττάρων συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα.....	61
Πίνακας 6.6 Επίδραση των κλασμάτων ANGF (47-58) και του εκχυλίσματος 2A από το οποίο προέρχονται, στον αριθμό των ενδοθηλιακών κυττάρων συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα.....	63
Πίνακας 6.7 Επίδραση των κλασμάτων ANGF (59-68) και του εκχυλίσματος 9A από το οποίο προέρχονται, στον αριθμό των ενδοθηλιακών κυττάρων συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα.....	65
Πίνακας 6.8 Επίδραση των κλασμάτων ANGF (69-78) και του εκχυλίσματος 16 A από το οποίο προέρχονται, στον αριθμό των ενδοθηλιακών κυττάρων συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα.....	66
Πίνακας 6.9 Επίδραση των κλασμάτων ANGF (79-88) και του εκχυλίσματος 147 A από το οποίο προέρχονται, στον αριθμό των ενδοθηλιακών κυττάρων συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα.....	67
Πίνακας 6.10 Επίδραση των κλασμάτων ANGF (89-98) και του εκχυλίσματος 152 A από το οποίο προέρχονται, στον αριθμό των ενδοθηλιακών κυττάρων συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα.....	69
Πίνακας 6.11 Επίδραση των κλασμάτων ANGF (99-113) και του εκχυλίσματος 27 A από το οποίο προέρχονται, στον αριθμό των ενδοθηλιακών κυττάρων συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα.....	70
Πίνακας 6.12 Ζεύγη τιμών οπτικής πυκνότητας πρότυπων δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης VEGF και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις.....	78
Πίνακας 6.13 Επίδραση φυσικών ενώσεων στα επίπεδα εκκρινόμενου VEGF στο υπερκείμενο κυττάρων Hep3B συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα.....	79

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

Συντμήσεις	Επεξήγηση
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor Αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου
FCPC	Fast Centrifugal Partition Chromatography Χρωματογραφίας Κατανομής με Φυγοκέντρηση
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FBS	Foetal Bovine Serum Ορό βοός
HAT	Hypoxanthine, Aminopterin, Thymidine
DMSO	Dimethylsulfoxide Διμεθυλοσουλφοξειδίο
PBS	Phosphate Buffer Saline
BSA	Bovine serum albumin
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
SEM	Standard error of the mean
OD	Optical Density Οπτική Πκνότητα
EGCG	Epigallocatechin Gallate Γαλλικό άλας της επιγαλλοκατεχίνης
POH	Perillyl alcohol Περιλλόλ αλκοόλη

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

1 ΦΥΣΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

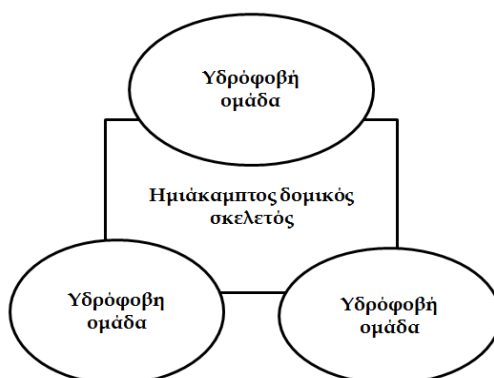
1.1 Γενικές πληροφορίες

Η φύση υπήρξε πάντα πλούσια πηγή μορίων με αξιόλογες βιολογικές δράσεις και σημαντικές εφαρμογές σε ποικίλους επιστημονικούς τομείς.

Ο όρος "φυσικά προϊόντα" περιλαμβάνει χημικές ενώσεις ή ουσίες που προέρχονται από ζωντανούς οργανισμούς, όπως φυτά, μύκητες, μικροοργανισμούς, θαλάσσιους οργανισμούς, χερσαία σπονδυλωτά και χερσαία σπονδυλωτά και παρουσιάζουν φαρμακολογική ή βιολογική δράση.

Χημικές ουσίες που προέρχονται από τα ζώα, τα φυτά και τα μικρόβια έχουν χρησιμοποιηθεί για την θεραπεία ανθρώπινων ασθενειών από την αρχή της επιστήμης της ιατρικής. Η συστηματική επιστημονική μελέτη των φυσικών προϊόντων ανάγεται στις αρχές του 19^{ου} αιώνα, όπου εκτός από την απομόνωσή τους άρχισε η μελέτη της δομής τους με τα αναλυτικά μέσα της εποχής. Ακόμη, έλαβε χώρα ο διαχωρισμός τους με σκοπό την χρήση τους πάνω στο ανθρώπινο γένος και την καταπολέμηση μεγάλου αριθμού παθήσεων [1].

Βασικό στοιχείο των φυσικών προϊόντων που τα κατέστησε ενώσεις μεγάλης σημασίας για να μελετηθούν, είναι το γεγονός ότι πολλά από αυτά αποτελούν "προνομιακές δομές": ο ορισμός των "προνομιακών δομών" κατά IUPAC αναφέρει ότι είναι "οι δομές που αποτελούνται από ένα ημιάκαμπτο δομικό σκελετό (scaffold) ο οποίος είναι σε θέση να διαθέτει πολλαπλούς υδρόφοβους υποκαταστάτες χωρίς να υποβάλλεται σε υδρόφοβη κατάρρευση". Επομένως, σύμφωνα με τον ορισμό, ο κοινός "δομικός παρονομαστής" των προνομιακών δομών είναι η παρουσία ενός ημιάκαμπτου δομικού σκελετού που παρουσιάζει φαρμακοφόρα και πιθανόν υδρόφοβα χαρακτηριστικά στην περιφέρεια του (Σχήμα 1.1). Η περιορισμένη ευελιξία του σκελετού εμποδίζει την υδρόφοβο κατάρρευση, όταν η ένωση εκτίθεται σε υδατικό μέσο. Ως εκ τούτου, διατηρεί σε μεγάλο ποσοστό τη δυνατότητα δέσμευσης στο μόριο-στόχο.



Σχήμα 1.1 Σχηματική αναπαράσταση προνομιακής δομής

Επιπροσθέτως, εκτός από την αποτροπή μιας υδρόφοβης κατάρρευσης, αποκρύπτοντας μέρος της επιφάνειας του μορίου λόγω αλληλεπίδρασης με το στόχο, η περιορισμένη ευελιξία μειώνει το εντροπικό "κόστος" στην ισορροπία δέσμευσης, αυξάνοντας έτσι την ελεύθερη ενέργεια δέσμευσης και τη συγγένεια με τον στόχο. Ο όρος προνομιακή δομή αντικατοπτρίζει την ικανότητα συγκεκριμένων μορίων να φιλοξενούν διάφορα φαρμακοφόρα τμήματα και επομένως να εμφανίζονται σε δομές διαφόρων δραστικών ενώσεων [2].

1.2 Φυσικά προϊόντα από φυτικές πηγές

Τα φυτά αποτελούν ιστορικά τη σημαντικότερη πηγή για την ανακάλυψη νέων φαρμακευτικών ουσιών παρά την τεράστια πρόοδο που έχει συντελεστεί στη χημική σύνθεση νέων φαρμάκων. Η ανάγκη του ανθρώπου να αντιμετωπίσει τις διάφορες ασθένειες, τον οδήγησαν από πολύ νωρίς να αναζητήσει εφόδια, που θα τον βοηθήσουν στην ίαση του. Η αναγκαιότητα αυτή τον έστρεψε, κυρίως, προς τον τεράστιο πλούτο του φυτικού βασιλείου, όπου με την παρατήρηση και τη σταδιακή επισταμένη μελέτη πέτυχε να χρησιμοποιήσει διάφορα φυτικά προϊόντα για θεραπευτικές ανάγκες. Πιο συγκεκριμένα, από τα 520 νέα φάρμακα που εγκρίθηκαν τη δεκαετία 1983-1994, το 39% ήταν φυσικά προϊόντα ή προέρχονταν από φυσικά προϊόντα.

Οι λόγοι για τους οποίους τα φυτικά προϊόντα εξακολουθούν να παρουσιάζουν φαρμακευτικό ενδιαφέρον είναι οι εξής:

- Οι περισσότερες κατηγορίες φαρμάκων που χρησιμοποιούνται σήμερα είτε περιέχουν φυτικά προϊόντα είτε η σύνθεσή τους έχει βασιστεί στη χημική δομή φυσικών προϊόντων, όπως τα περισσότερα αντιβιοτικά, ανοσοκατασταλτικά και αντικαρκινικά φάρμακα.
- Για τα περισσότερα φάρμακα που έχουν συντεθεί χημικά, έχουν βρεθεί φυτικά προϊόντα με ανάλογη δράση.
- Τα περισσότερα φυσικά προϊόντα είναι μικρού μοριακού βάρους και μπορούν εύκολα να απορροφηθούν και να μεταβολιστούν από τον ανθρώπινο οργανισμό.

Τα φυτικά είδη υπολογίζονται σε περισσότερα από 250.000, αλλά μόνο ένα μικρό ποσοστό τους έχει μελετηθεί για την εύρεση βιολογικά δραστικών ουσιών. Η αναγνώριση νέων φυσικών συστατικών αυξάνεται κατά 10.000 περίπου το χρόνο και υπάρχει η πεποίθηση ότι κάθε σημαντικό βιολογικό μόριο του ανθρώπινου οργανισμού αποτελεί στόχο για τουλάχιστον μία φυτική ουσία [3],[4].

1.3 Χαρακτηριστικές ενώσεις φυτικών προϊόντων

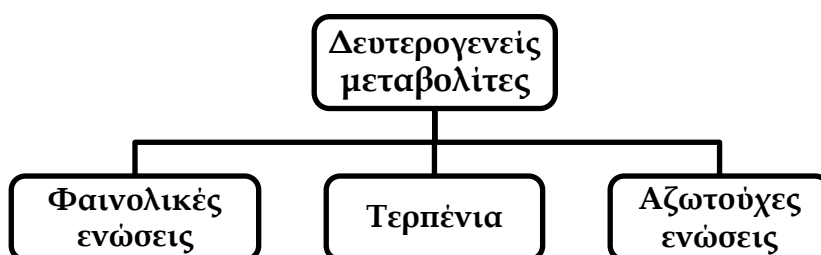
Τα χημικά συστατικά των φυτικών κυττάρων τα οποία εκδηλώνουν βιολογικές δράσεις σε ανθρώπινα και ζωικά κύτταρα, ανάλογα με την σχετική τους συγκέντρωση στα φυτά και την πρωταρχική λειτουργία τους, κατανέμονται σε δύο κύριες ομάδες: στους πρωτογενείς μεταβολίτες, η συσσώρευση των οποίων καλύπτει θρεπτικές και δομικές ανάγκες, και στους δευτερογενείς μεταβολίτες που δρουν ως ορμόνες, φαρμακευτικές ουσίες και τοξίνες. Εξ'ορισμού, ο **πρωτογενής μεταβολισμός** ορίζεται ως μεταβολική δραστηριότητα που έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση των απαραίτητων συστατικών τα οποία συγκροτούν τη θεμελιώδη δομή των φυτικών κυττάρων. Πιο αναλυτικά, οδηγεί στην παραγωγή σακχάρων

(υδατάνθρακες) που συνιστούν δομικά και θρεπτικά στοιχεία, αμινοξέων που αποτελούν δομικά στοιχεία και εκδηλώνουν ενζυμική δράση, λιπιδίων που αποτελούν συστατικά των μεμβρανών και θρεπτικά συστατικά και νουκλεοτιδίων που αποτελούν δομικές μονάδες των γονιδίων.

Ενώ, όσον αφορά τον **δευτερογενή μεταβολισμό**, πρόκειται για μια μεταβολική δραστηριότητα που έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση μεταβολικών προϊόντων τα οποία παράγονται μόνο σε επιμέρους ιστούς όργανα και σε συγκεκριμένα στάδια ανάπτυξης. Η δράση τους στα φυτά συνήθως σχετίζεται με την ρύθμιση του μεταβολισμού και/ή της αύξησης, την απόδοση του αρώματος και του χρωματισμού των τμημάτων του φυτού και την προστασία έναντι παθογόνων οργανισμών. Αν και ο δευτερογενής μεταβολισμός γενικά αποτελεί το 10% του συνολικού μεταβολισμού στα φυτά ωστόσο, τα προϊόντα του αποτελούν τα κύρια συστατικά με φαρμακολογική δράση.

Για τον λόγο αυτό στη σύγχρονη εποχή ο όρος «φυσικό προϊόν» έχει περιοριστεί αποκλειστικά στα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτικών και ζωικών οργανισμών [5].

Με βάση τη βιοσυνθετική οδό μέσω της οποίας παράγονται και τα χαρακτηριστικά του μορίου τους, οι δευτερογενείς μεταβολίτες κατατάσσονται συνήθως σε τρεις μεγάλες ομάδες: φαινολικές ενώσεις, τερπένια και αζωτούχες ενώσεις [6].

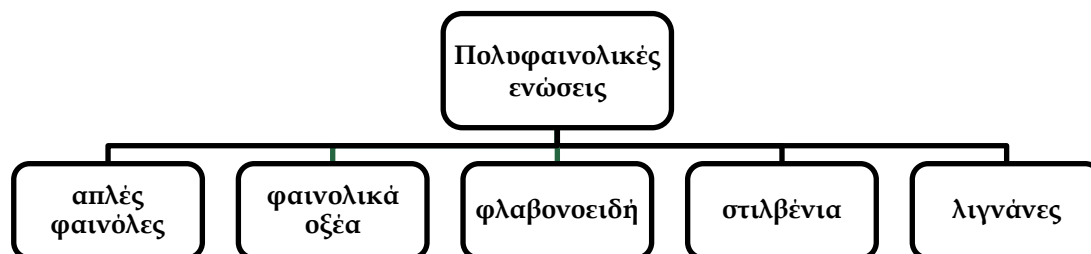


Σχήμα 1.2 Κατηγοριοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών

1.3.1 Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις ή πολυφαινόλες είναι ευρέως διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο, όπου έχουν ήδη ταυτοποιηθεί περισσότερες από 8000 φαινολικές δομές (Harborne et al., 1993). Στη διεθνή βιβλιογραφία έχει επικρατήσει με τον όρο «πολυφαινόλες» να νοείται μια μεγάλη ομάδα ενώσεων με ένα ή περισσότερα υδροξύλια απ' ευθείας συνδεδεμένα σε έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους. Επίσης, οι πολυφαινόλες είναι είτε απλά μόρια όπως τα φαινολικά οξέα, είτε υψηλά πολυμερισμένες ενώσεις όπως οι ταννίνες. Η πλειονότητα τους είναι συζευγμένες με υδατάνθρακες μέσω των υδροξυλίων τους. Τα συζευγμένα σάκχαρα μπορεί να είναι μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες ή ολιγοσακχαρίτες. Το πιο κοινό σάκχαρο που απαντάται είναι η γλυκόζη και έπονται η γαλακτόζη, ξυλόζη, ραμνόζη, αραβινόζη κ.α. Επίσης, και άλλα συστατικά μπορούν να συνδεθούν με

πολυφαινολικές δομές, όπως αμίνες, οργανικά οξέα, καρβοξυλικά οξέα, λιπίδια κ.α. Οι πολυφαινολικές ενώσεις διακρίνονται σε δεκατέσσερις μεγάλες κατηγορίες: απλές φαινόλες, βενζοκινόνες, φαινολικά οξέα, ακετοφαινόλες, φαινυλοξικά οξέα, φαινυλοπροπανοειδή, (υδροξυ)κίναμμοικά οξέα, κουμαρίνες, χρωμόνες, ναφθοκινόνες, ξανθόνες, στυλβένια, ανθρακινόνες, φλαβονοειδή και λιγνάνες. Οι περισσότερο μελετημένες κατηγορίες των φαινολικών ενώσεων είναι οι απλές φαινόλες, τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα στυλβένια και οι λιγνάνες (Σχήμα 1.3) [7],[8],[9].



Σχήμα 1.3 Κατηγοριοποίηση πολυφαινολικών ενώσεων

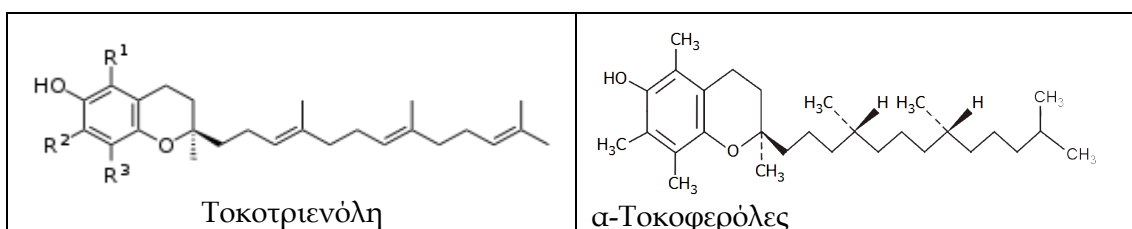
Οι φαινολικές ενώσεις βρίσκονται στα περισσότερα, αν όχι σε όλα τα φυτά, αποτελούν προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού του και είναι απαραίτητα συστατικά της φυσιολογίας τους, καθώς εμπλέκονται στην ανάπτυξη, στην παραγωγή τους και στη μορφολογία τους. Επίσης, παρέχουν προστασία στα φυτά έναντι των παθογόνων οργανισμών και μερικές φορές έναντι των φυτοφάγων ζώων, καθώς τα κάνουν στυφά και σκληρά. Οι φαινολικές ενώσεις μπορεί να καθορίσουν το χρώμα των φυτών (π.χ. οι ανθοκυανίνες είναι κόκκινες, μπλε ή μοβ), ωστόσο, δεν είναι όλες χρωματισμένες[10].

1.3.1.1 Απλές Φαινόλες

Στην κατηγορία των απλών φαινολών ανήκουν οι τοκοφερόλες και οι τοκοτριενόλες

- Τοκοτριενόλες

Οι τοκοτριενόλες είναι μεθυλοπαράγωγα της τοκοτριενόλης με μία ακόρεστη πλευρική αλυσίδα ισοπρενοειδούς ή φαρνεσουλίου με τρεις διπλούς δεσμούς. Υπάρχουν 4 διαφορετικά είδη τοκοτριενολών η α-, η β-, η γ- και η δ-τοκοτριενόλη.



Σχήμα 1.4 Βασικές δομές της τοκοτριενόλης και της α- τοκοφερόλης

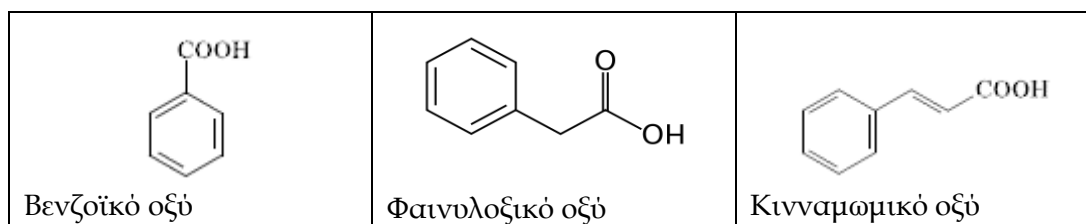
- Τοκοφερόλες - Βιταμίνη E

Η βιταμίνη E είναι μία μη τοξική, λιποδιαλυτή βιταμίνη. Ουσιαστικά, η ονομασία βιταμίνη E χρησιμοποιείται για μια ομάδα ουσιών με παρόμοιες βιολογικές λειτουργίες, τις α-, β-, γ- και δ-τοκοφερόλες. Οι τοκοφερόλες είναι μεθυλοπαράγωγα της τοκόλης. Όλες αυτές οι

μορφές αποτελούνται από ένα υποκατεστημένο από υδροξύλια σύστημα δαχτυλίων (δακτύλιος χρωμανόλης) με κορεσμένη φυτυλ- πλευρική αλυσίδα. Η φυτυλ-ομάδα συνδέεται με τον δακτύλιο της χρωμανόλης στη θέση 2 του δαχτυλίου. Η ομάδα υδροξυλίου του δαχτυλίου της χρωμανόλης θεωρείται υπεύθυνη για την αντιοξειδωτική δράση της βιταμίνης. Η πλέον δραστική μορφή τοκοφερόλης είναι η α-τοκοφερόλη.

1.3.1.2 Φαινολικά οξέα

Τα φαινολοξέα αποτελούν μία ομάδα οργανικών οξέων και εμπεριέχουν όλες τις οργανικές ενώσεις που έχουν το λιγότερο μία καρβοξυλομάδα και ένα φαινολικό υδροξύλιο. Ο όρος όμως, χρησιμοποιείται και για παράγωγα του βενζοϊκού και του κινναμωμικού οξέος που είναι πολύ διαδεδομένα στα φυτά ελεύθερα, σαν εστέρες ή σαν γλυκοσίδες.



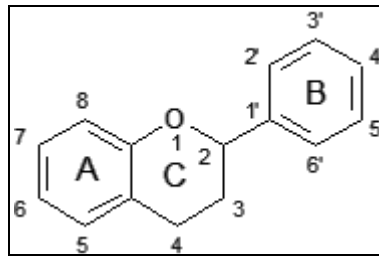
Σχήμα 1.5 Βασικές δομές του βενζοϊκού, φαινυλοξικού και κινναμωμικού οξέος

Στα παράγωγα του βενζοϊκού ανήκουν το σαλικυλικό και το γαλλικό οξύ, ενώ στα παράγωγα του κινναμωμικού, συγκαταλέγονται μεταξύ άλλων, το καφεϊκό και το πικουμαρικό οξύ. Οι ενώσεις αυτές χαρακτηρίζονται από αυξημένες αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντικρκινικές και αντικαρκινικές ιδιότητες [9].

1.3.1.3 Φλαβονοειδή

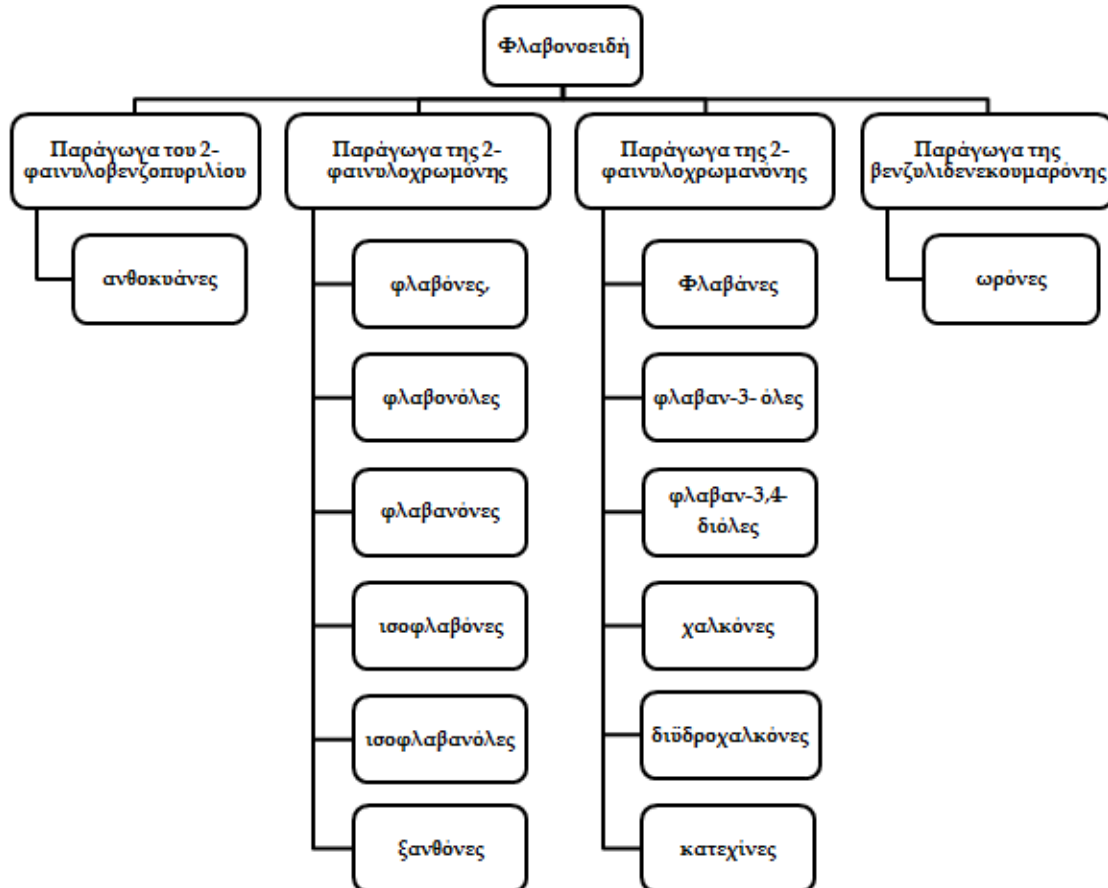
Τα φλαβονοειδή είναι πολυφαινολικές ενώσεις, πολύ διαδεδομένες στα φυτά. Πολλές από αυτές είναι υπεύθυνες για το χρώμα των καρπών και των ανθέων. Δεν είναι βιταμίνες, παρά το γεγονός ότι αρχικά οι ερευνητές που τις ανακάλυψαν θεώρησαν ότι αποτελούν σημαντικές βιταμίνες στην λειτουργία του οργανισμού. Πιο συγκεκριμένα, γίνεται λόγος για ουσίες οι οποίες περιέχονται στα φυτά, προωθούν την δράση της βιταμίνης C και εμποδίζουν την οξείδωσή της. Αρχικά, πήραν το όνομα βιταμίνη P αλλά έπειτα κατέληξαν να ονομάζονται φλαβονοειδή. Πρόκειται, λοιπόν για ουσίες που υπάρχουν μόνο στα φυτά και αποτελούν τμήμα των αμυντικών μηχανισμών τους, καθώς προσφέρουν ανοσία απέναντι σε μύκητες, έντομα και άλλους επιβλαβείς οργανισμούς [11].

Η χημική τους δομή αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους συνδεδεμένους μέσω τριών ατόμων άνθρακα, που συνήθως σχηματίζουν ένα οξυγονούχο αρωματικό δακτύλιο. Οι διαφορές μεταξύ των τάξεων οφείλονται στον πυρανικό δακτύλιο (απουσία ή παρουσία διπλού δεσμού, παρουσία 3-υδροξυ και/ή 2- οξυ ομάδων) και στον αριθμό των υδροξυλίων στους δακτυλίους A και B [12].



Σχήμα 1.6 Βασική δομή και σύστημα αρίθμησης των φλαβονοειδών

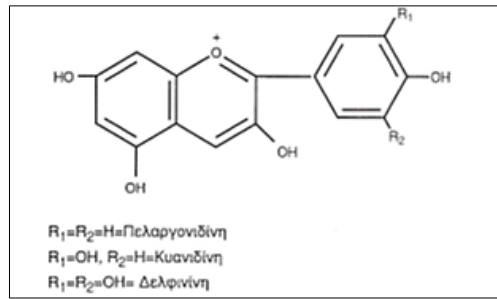
Πιο συγκεκριμένα, ανάλογα του βαθμού οξείδωσης του πυρανικού τους δακτυλίου διαιρούνται στις εξής κατηγορίες:



Σχήμα 1.7 Κατηγοριοποίηση φλαβονοειδή

- **Ανθοκυάνες**

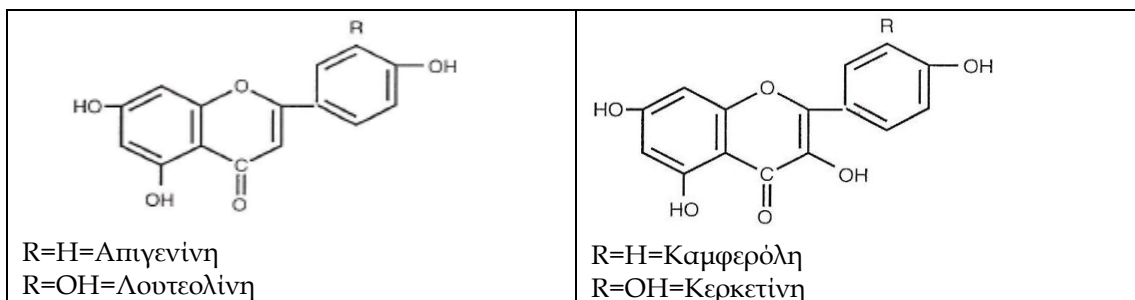
Η ονομασία ανθοκυάνη αρχικώς χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει τις ενώσεις που ήταν υπεύθυνες για το χρώμα των ανθέων του αραβοσίτου. Αργότερα, εφαρμόστηκε σε ενώσεις που ήταν διαλυτές στο νερό και το χρώμα τους ήταν κόκκινο, μωβ, μπλε, βιολέτ στους καρπούς και τα άνθη. Παράγονται από το κατιόν 2-φαιτυλοβενζοπυριλίου, κοινώς ως κατιόν φλαβίλιο, και ο γενικός τους τύπος περιέχει την ομάδα OH στη θέση C-3 [13].



Σχήμα 1.8 Βασική δομή αωθοκυάνης

- Φλαβόνες - Φλαβονόλες

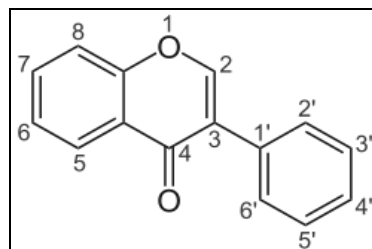
Ο όρος "flavone" προέρχεται από το λατινικό flavus=κίτρινο. Συναντούνται είτε ως άγλυκα είτε σε μορφή γλυκοσιδών. Οι φυσικές φλαβόνες είναι συνήθως ολιγοϋδροξυλιωμένα παράγωγα. Ο βαθμός υδροξυλίωσης κυμαίνεται από 0-7. Μπορεί να έχει βιογενετική σημασία διότι σε χαμηλό βαθμό υδροξυλίωσης επικρατούν οι φλαβόνες (3-θέση ελεύθερη), ενώ οι πολυϋδροξυλιωμένες συνήθως είναι φλαβονόλες (με OH στη θέση C-3). Η ύπαρξη ή μη OH στη θέση C-3 έχει σημαντική βιοσυνθετική, φυσιολογική, φαρμακολογική και αναλυτική σημασία. Όσον αφορά τις σπουδαιότερες φλαβόνες, είναι η απιγενίνη, λουτεολίνη και οι γλυκοσίδες τους και οι σπουδαιότερες φλαβονόλες είναι η κερκετίνη, καιμφερόλη, μυρικετίνη, ισοραμνετίνη και οι γλυκοσίδες τους [14].



Σχήμα 1.9 Βασικές δομές Φλαβόνων - Φλαβονόλων

- Ισοφλαβόνες

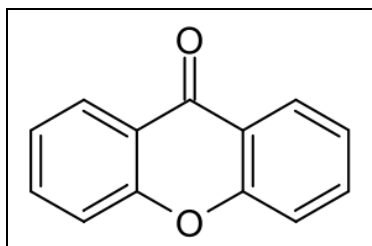
Οι ισοφλαβόνες είναι μια κατηγορία ενώσεων που παράγονται από τα φυτά και έχουν παρόμοια δομή με τα οιστρογόνα του ανθρώπου γι' αυτό το λόγο είναι ταξινομημένα ως φυτοοιστρογόνα. Είναι 3-φαινυλοχρωμόνες και διαίρονται σε 12 κατηγορίες ανάλογα με τα επίπεδα οξειδωσης και το είδος του δακτυλίου που ενώνεται με το σκελετό της ισοφλαβόνης. Οι ενώσεις αυτές έχουν έντονο αντιμυκητοκτόνο και αντιμικροβιακή δράση [9].



Σχήμα 1.10 Βασική δομή ισοφλαβονών

- Ξανθόνες

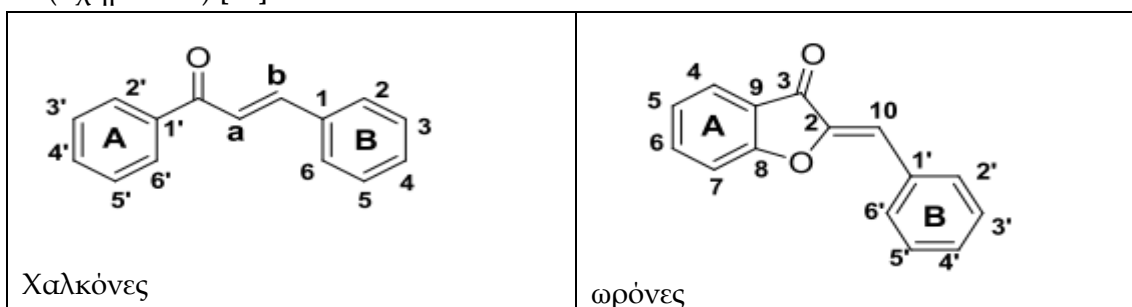
Οι ενώσεις αυτές διαφέρουν των φλαβονών και φλαβονολών διότι ο φαινολικός δακτύλιος συνδέεται με το βενζοπυράνιο στη θέση 9,10. Οι ξανθόνες προκαλούν κυτταροτοξικότητα και αντικαρκινική δράση [9].



Σχήμα 1.11 Βασική δομή ξανθονών

- Χαλκόνες, ωρόνες, διϋδροχαλκόνες

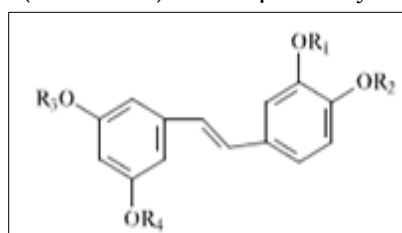
Είναι μικρές ομάδες χρωστικών, οι οποίες έχουν κίτρινο χρώμα και σε αλκαλικό περιβάλλον μετατρέπεται σε κόκκινο. Ο οικολογικός ρόλος τους στη φύση σε σχέση με το χρώμα των φυτών και κυρίως των ανθέων, είναι σημαντικός. Οι διϋδροχαλκόνες είναι υδρογονωμένα παράγωγα των χαλκονών και είναι άχρωμες. Οι χαλκόνες είναι ενώσεις με ανοικτή αλυσίδα, πρόδρομοι των φλαβονοειδών, ευρέως ευρισκόμενες σε βρώσιμα φυτά, ενώ οι ωρόνες είναι πιο σπάνια απαντώμενα και λιγότερο μελετηθέντα φλαβονοειδή, υπεύθυνα για το κίτρινο χρωματισμό στα καλλωπιστικά φυτά. Το κοινό δομικό μοτίβο αυτών των φλαβονοειδών είναι το α, β-ακόρεστο καρβονυλικό σύστημα και η παρουσία δύο αρωματικών δακτυλίων Α και Β (Σχήμα 1.12) [15].



Σχήμα 1.12 Γενική δομή των χαλκονών και των ωρονών

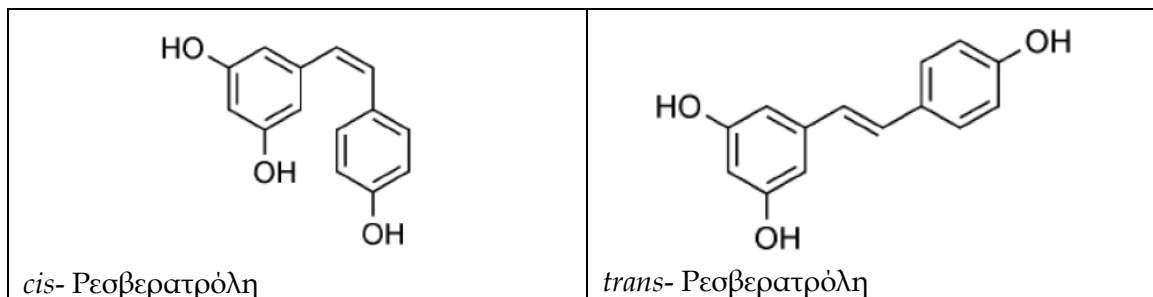
1.3.1.4 Στιλβένια

Τα στιλβένια είναι πολυφαινολικές ενώσεις που παράγονται από διάφορους φυτικούς οργανισμούς ως απάντηση σε καταστάσεις stress. Επομένως, όταν ένα φυτό αντιμετωπίζει ένα εξωτερικό παράγοντα κινδύνου (π.χ. μικρόβια όπως ο βοτρυτής, κακές καιρικές συνθήκες), κινεί τους μηχανισμούς σύνθεσης αυτών των ουσιών. Όσον αφορά τον χημικό τύπο των στιλβενίων, αποτελείται από δύο φαινυλομάδες, οι οποίες ενώνονται μέσω μιας αλυσίδας δύο ατόμων άνθρακα (C6-C2-C6) και παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα [9].



Σχήμα 1.13 Βασική δομή στιλβενίων.

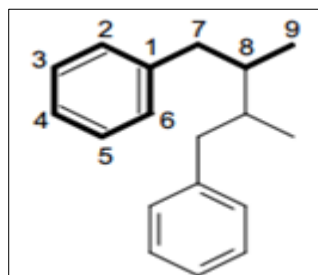
Τα στυλβένια απαντούν ευρύτατα στο φυτικό βασίλειο, καθώς ανιχνεύονται στα σταφύλια, τα φιστίκια, τα όσπρια, τον ευκάλυπτο, σε φυτά της οικογένειας Leguminosae και αλλού. Μέχρι το 1980 είχαν εξακριβωθεί περίπου 100 δομές στυλβενοειδών, ενώ σήμερα είναι γνωστές περί τις 300. Χαρακτηριστική ένωση της ομάδας αυτής είναι η ρεσβερατρόλη (3,5,4'-τριυδροξυστυλβένιο), η οποία συναντάται ως *cis*- και *trans*-ισομερές (Σχήμα) [16].



Σχήμα 1.14 Δομή της ρεσβερατρόλης

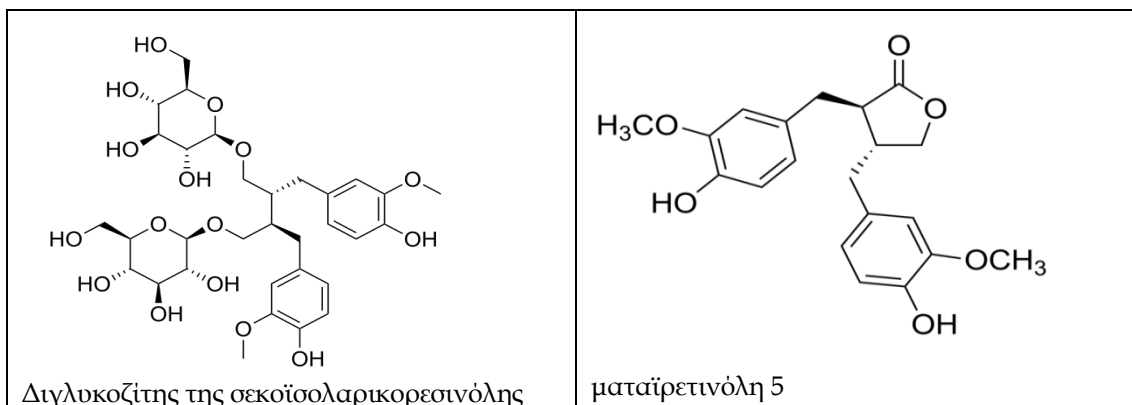
1.3.1.5 Λιγνάνες

Οι λιγνάνες είναι χημικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους οι οποίες αποτελούν διμερή και ολιγομερή *p*-υδροξυ-φαινυλοπροπανίου. Συγκεκριμένα, πρόκειται για πολυφαινολικές ενώσεις που προέρχονται από την φαινυλαλανίνη των φυτών, μέσω του διμερισμού των υποκαταστημένων κινναμικών αλκοολών.



Σχήμα 1.15 Βασική δομή λιγνάνων

Οι λιγνάνες αποτελούν μία από τις δύο κύριες κατηγορίες φυτο-οιστρογόνων. Ο διγλυκοζίτης της σεκοΐσολαρικορεσινόλης και η ματαΐρετινόλη 5 είναι δύο διμερή που αποτελούν τους κυριότερους εκπροσώπους της κατηγορίας των λιγνάνων [7].

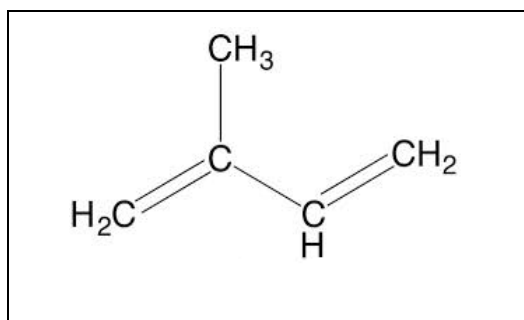


Σχήμα 1.16 Δομές των δυο κύριων φυτο-λιγνάνων

1.3.2 Τερπένια

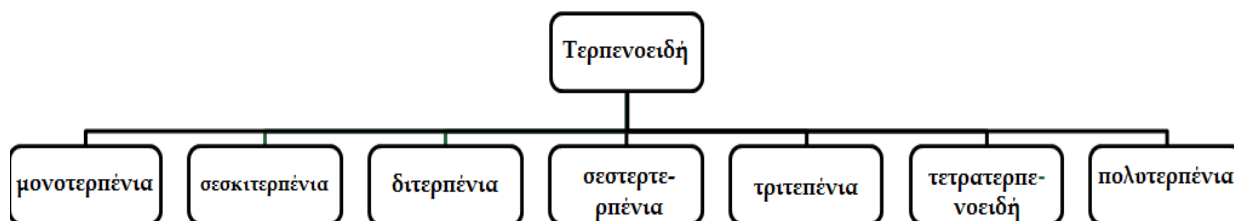
Τα τερπενοειδή ή τερπένια αποτελούν την πιο δομικά ποικίλη κατηγορία των φυτικών φυσικών προϊόντων. Όλα τα τερπενοειδή, προέρχονται από επαναληπτική σύντηξη μονάδων με πέντε άνθρακες, που βασίζονται στον σκελετό του ισοπεντανίου. Αυτά τα μονομερή γενικά αναφέρονται ως μονάδες ισοπρενίου καθώς η θερμική αποσύνθεση πολλών τερπενοειδών αποδίδει αέριο ισοπρένιο ως προϊόν. Σε κατάλληλες χημικές συνθήκες το ισοπρένιο πολυμερίζεται σε μακρομόρια που περιέχουν αριθμό ατόμων άνθρακα πολλαπλάσιο του πέντε, δημιουργώντας έτσι πολυάριθμους σκελετούς τερπενοειδών.

Τα μικρότερα τερπενοειδή περιέχουν μια μονάδα ισοπρενίου και ονομάζονται ημιτερπενοειδή. Το πιο γνωστό είναι το ίδιο το ισοπρένιο, ένα πτητικό προϊόν που εκλύεται από φωτοσυνθετικά ενεργούς ιστούς.



Σχήμα 1.17 Δομή ισοπρενίου

Ανάλογα με τον αριθμό των μονάδων ισοπρενίου διαιρούνται σε μονοτερπένια, σεοκίτερπένια, διτερπένια, σεστερτερπένια, τριτερπένια και πολυτερπένια.



Σχήμα 1.18 Κατηγοριοποίηση Τερπενοειδών

- Μονοτερπένια ονομάζονται τα τερπενοειδή που προέρχονται από δύο ομάδες ισοπρενίου και αποτελούνται από δέκα άτομα άνθρακα (C10). Χαρακτηριστικά παραδείγματα το λεμονένιο, περιλλυλ αλκοολη, γερανιόλη και τερπινεόλη.
- Σεοκίτερπένια ονομάζονται τα τερπενοειδή που προέρχονται από τρεις ομάδες ισοπρενίου και αποτελούνται από δεκαπέντε άτομα άνθρακα (C15). Χαρακτηριστικά παραδείγματα το β-φαρνεσένιο, α-καριοφυλένιο και η φαρνεσόλη.
- Διτερπένια ονομάζονται τα τερπενοειδή που προέρχονται από τέσσερις ομάδες ισοπρενίου και αποτελούνται από είκοσι άτομα άνθρακα (C20). Χαρακτηριστικά παραδείγματα η φοροκολίνη και η καφεστόλη.
- Σεστερπένια ονομάζονται τα τερπενοειδή που προέρχονται από πέντε ομάδες ισοπρενίου και αποτελούνται από εικοσιπέντε άτομα άνθρακα (C20). Χαρακτηριστικό παραδειγμά η γερανυλ-φαρνεσόλη

- Τριτερπένια ονομάζονται τα τερπενοειδή που προέρχονται από έξη ομάδες ισοπρενίου και αποτελούνται από τριάντα άτομα άνθρακα (C₃₀). Χαρακτηριστικό παράδειγμα το σκουαλένιο.
- Τετρατερπένια ονομάζονται τα τερπενοειδή που προέρχονται από οκτώ ομάδες ισοπρενίου και αποτελούνται από σαράντα άτομα άνθρακα (C₄₀). Χαρακτηριστικό παράδειγμα τα καροτενοειδή.
- Πολυτερπένια, είναι η ομάδα τερπενίων που έχουν παραπάνω από 8 μονάδες ισοπρενίου και συγκαταλέγονται στις μακράς αλυσίδας πολυπρετόλες, που συμμετέχουν στις αντιδράσεις μεταφοράς των σακχάρων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα το β-καροτένιο [17].

1.3.3 Αζωτούχες ενώσεις

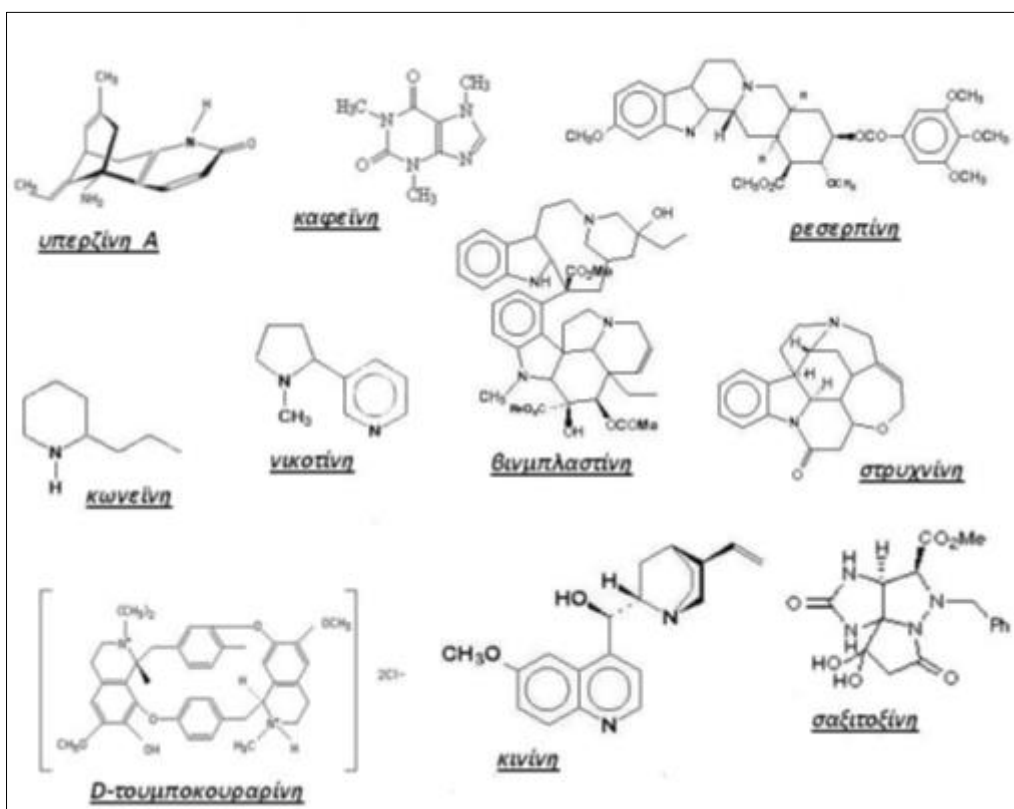
Η ομάδα των αζωτούχων δευτερογενών μεταβολιτών απαρτίζεται από ενώσεις, οι οποίες προέρχονται κυρίως από αμινοξέα. Πρόκειται για μια ετερογενή ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών, η οποία περιλαμβάνει τα αλκαλοειδή, τα κυανογόνα γλυκοσίδια, τα θειογλυκοσίδια, αμίνες και τα μη πρωτεϊνικά αμινοξέα οι οποίες παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της τοξικότητάς τους για τον ανθρώπινο οργανισμό, αλλά και των θεραπευτικών τους ιδιοτήτων. Οι μεταβολίτες αυτοί παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και σημαντικές εφαρμογές (π.χ. στη παρασκευή φαρμάκων, στην κοσμητολογία, στη γεωργία και στη βιομηχανία τροφίμων, κ.ά.).

1.3.3.1 Αλκαλοειδή

Τα αλκαλοειδή (alkaloids) είναι μία ομάδα οργανικών αζωτούχων ουσιών με πολύπλοκη σύσταση, που περιέχονται στα φυτά και ασκούν πολλές λειτουργίες του οργανισμού (νικοτίνη, καφεΐνη, τείνη, μορφίνη, κινίνη, καψαϊκίνη, πιπεριδίνη, τζιντζερόλη, παραδόλη κ.α). Τα περισσότερα αλκαλοειδή είναι πολύπλοκες ετεροκυκλικές ενώσεις, στις οποίες το άζωτο συμμετέχει στο σχηματισμό του ετεροκυκλικού τους δακτύλιου. Τα αλκαλοειδή είναι σώματα συνήθως στερεά, κρυσταλλικά, άχρωμα, εκτός από ορισμένα υγρά χρωματισμένα, άοσμα, αδιάλυτα ή λίγο διαλυτά στο νερό, ευδιάλυτα σε οργανικούς διαλύτες. Το όνομα τους δόθηκε από το 1819 από έναν Γερμανό Χημικό Carl F.W. Meissner και προέρχεται από τη λατινική ρίζα «alkali». Εύκολος τρόπος ώστε να αποφασιστεί αν ένα χημικό ανήκει η όχι σε αυτή τη μεγάλη οικογένεια είναι η κατάληξη του. Παρατηρείται ότι όλα τα αλκαλοειδή έχουν ονομασία με κατάληξη *-ίνη*. Σήμερα είναι γνωστά πάνω από 3000 αλκαλοειδή και ταξινομούνται επιμέρους, ανάλογα του συντακτικού τύπου τους και με βάση τη φύση και τον αριθμό των πυρήνων τους, (δακτύλιοι ατόμων), καθώς και με τους υποκαταστάτες που συνδέουν τα αλκαλοειδή κατατάσσονται στις παρακάτω κατηγορίες: (Καραμπουρνιώτης et al 1999)

- Αλκαλοειδή από την ορνιθίνη (πυρολιδίνες, τροπάνια, πυρολιζιδίνες)
- Αλκαλοειδή από τη λυσίνη (πιπεριδίνες, κινολιζιδίνες, ινδολιζιδίνες)
- Αλκαλοειδή από το νικοτινικό οξύ (πυριδίνες)
- Αλκαλοειδή από την τυροσίνη (τετραυδροισοκινολίνες, τροποποιημένες ισοκινολίνες, μορφίνες, οπιοειδή)
- Αλκαλοειδή από τη θρυπτοφάνη (ινδόλια, καρβολίνια, κινολίνες)

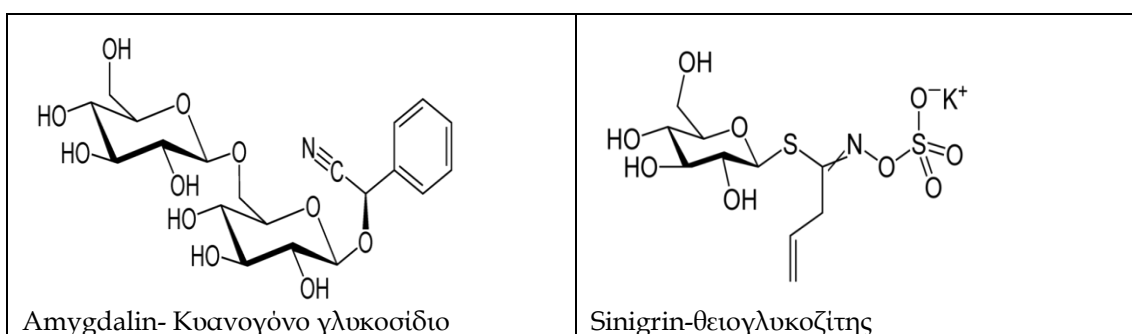
- Αλκαλοειδή από το ανθρανιλικό οξύ (κινολίνες, ακριδίνες)
- Αλκαλοειδή από την ισιδίνη (ιμιδαζόλια)



Σχήμα 1.19 Δομές χαρακτηριστικών παραδειγμάτων αλκαλοειδών.

1.3.3.2 Κρανογόνα γλυκοσίδια και θειογλυκοζίτες

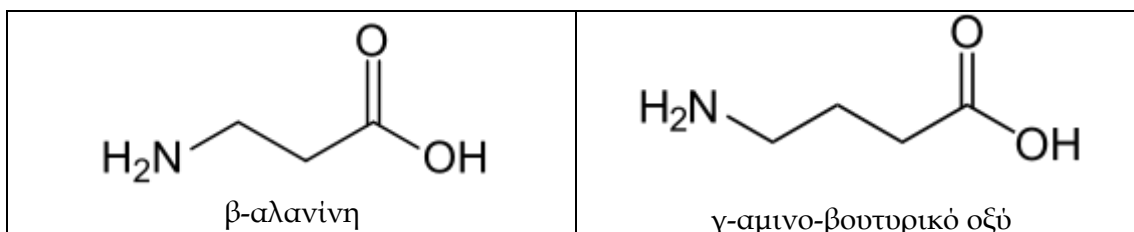
Τα κρανογόνα γλυκοσίδια αφορούν δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι ενισχύουν το αμυντικό οπλοστάσιο ορισμένων φυτών. Πρόκειται για αζωτούχες ενώσεις το μόριο των οποίων συνδέεται με ένα σάκχαρο. Υπό κανονικές συνθήκες δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερη τοξικότητα. Ωστόσο, σε περίπτωση τραυματισμού του ιστού που τα περιέχει, διασπώνται από κατάλληλα υδρολυτικά ένζυμα, τα οποία στον άθικτο ιστό εντοπίζονται σε διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα ή κύτταρα, παράγοντας προϊόντα διάσπασης ορισμένα από τα οποία είναι εξαιρετικά τοξικά (π.χ. ρίζα κρανίου).



Σχήμα 1.20 Βασικές δομές μερικών από των χαρακτηριστικών παραδειγμάτων κρανογόνων γλυκοσίδων και θειογλυκοζιτών

1.3.3.3 Μη πρωτεϊνικά αμινοξέα

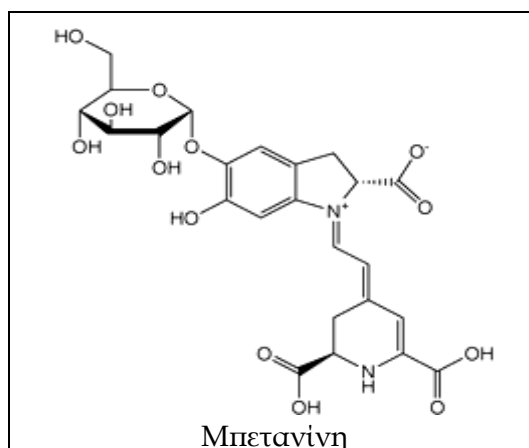
Οι βασικές δομικές μονάδες των πρωτεϊνών είναι τα αμινοξέα. Τα αμινοξέα τα διακρίνουμε στα πρωτεϊνικά αμινοξέα και στα μη πρωτεϊνικά αμινοξέα. Τα πρώτα συμμετέχουν στη σύνθεση πρωτεϊνών ενώ τα δεύτερα τα συναντάμε μόνο σε ελεύθερες μορφές. Τα κυριότερα είναι β-αλανίνη (παντοθενικό οξύ), κιτρουλλίνη (κύκλος της ουρίας), ορνιθίνη (κύκλος της ουρίας), γ-αμινο-βουτυρικό οξύ (GABA, νευροδιαβιβαστής), D-αλανίνη (κυτταρικό τοίχωμα), D-σερίνη, 4-υδροξυ-προλίνη, 5-υδροξυ-λουσινη.



Σχήμα 1.21 Βασικές δομές μερικών από των χαρακτηριστικών παραδειγμάτων μη πρωτεϊνικών αμινοξέων

1.3.3.4 Μπεταλαΐνες

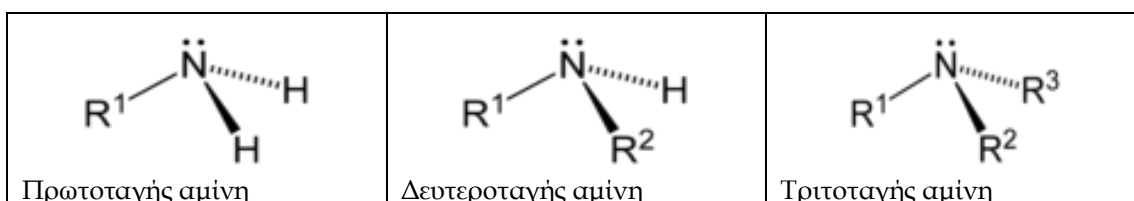
Χρωστικές, οι οποίες δίδουν χαρακτηριστικούς χρωματισμούς σε όργανα και ιστούς σε ορισμένα είδη φυτών, με χαρακτηριστικό εκπρόσωπο την μπετανίνη των κονδύλων των τεύτλων.



Σχήμα 1.22 Βασική δομή μπετανίνης

1.3.3.5 Αμίνες

Οι αμίνες είναι οι αζωτούχες οργανικές ενώσεις με μία τουλάχιστον αμινομάδα, δηλαδή -NH₂ ή -NH- ή >N-, ως κύρια χαρακτηριστική ομάδα.



Σχήμα 1.23 Βασική δομή αμινών

Η αμινομάδα μπορεί να θεωρηθεί ότι προέρχεται από την αντικατάσταση ενός τουλάχιστον ατόμου υδρογόνου αμμωνίας με ένα τουλάχιστον υδροκαρβύλιο (ή υποκατεστημένο

παράγωγό του με χαρακτηριστικές ομάδες «κατώτερες» από την αμινομάδα). Ανάλογα με τον αριθμό των υδρογόνων της αμμωνίας που έχουν αντικατασταθεί από υδροκαρβύλια οι αμίνες διακρίνονται σε πρωτοταγείς, δευτεροταγείς και τριτοταγείς. Οι αμίνες συναντώνται σε πολλές βιολογικές λειτουργίες. Μία μεγάλη κατηγορία νευροδιαβιβαστών είναι αμίνες και είναι γνωστές ως κατεχολαμίνες. Χαρακτηριστική ένωση αυτής της κατηγορίας είναι η αδρεναλίνη. Πολλές αμίνες έχουν εθιστική δράση στους οργανισμούς και μία μεγάλη κατηγορία τέτοιων ενώσεων αποτελούν ναρκωτικές ουσίες, όπως η αμφεταμίνη. Λόγω της έντονης δράσης τους στον οργανισμό κάποιες χρησιμοποιούνται ως φαρμακευτικές ουσίες, ως ηρεμιστικά ή αντιαλλεργιογόνα. [18].

1.3.4 Βιολογική δράση δευτερογενών μεταβολιτών

Μετά από πολλές ερευνητικές μελέτες διαπιστώθηκε ότι ενώσεις και από τις τρεις ομάδες δευτεροταγών μεταβολιτών διαθέτουν σημαντική αντιμικροβιακή, αντικαρκινική, αντιφλεγμονώδη, αντιαλλεργική, αντιθρομβωτική, αντιμεταλλαξιογόνο και αγγειοδιασταλτική δράση. Αρκετές από τις δράσεις αυτές σχετίζονται με τις σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες αυτών των ενώσεων, δηλαδή στην ικανότητά τους να εξουδετερώνουν ποικίλες ελεύθερες ρίζες, όπως τις υπεροξυ-ρίζες των λιπιδίων που συντίθενται στα κύτταρα ως παραπροϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού και εμπλέκονται στην ανάπτυξη πολλών ασθενειών. Παρακάτω παρουσιάζονται συνοπτικά δυο από τις κύριες βιολογικές δράσεις που σχετίζονται με το περιεχόμενο αυτής της διπλωματικής.

- Αντικαρκινική δράση

Ένας μεγάλος αριθμός ενώσεων που ανήκουν στους δευτερογενείς μεταβολίτες έχουν σημαντική αντικαρκινική δράση. Τα συστατικά αυτά φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην παθογένεια του καρκίνου. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των ενώσεων αυτών είναι η πρώτη που μελετήθηκε. Τα αντιοξειδωτικά αυτά είναι σημαντικοί εκκαθαριστές πολλών οξειδωτικών μορίων όπως του ατομικού οξυγόνου και πολλών ελευθέρων ριζών, τα οποία εμπλέκονται στην καταστροφή του DNA και την δημιουργία όγκων. Συγκεκριμένα, απενεργοποιούν τις ελεύθερες ρίζες αντιδρώντας με αυτές και σχηματίζουν ενώσεις που δεν έχουν την τάση να δίνουν νέες ελεύθερες ρίζες. Επίσης, πολλές από αυτές τις ενώσεις έχουν σημαντική επίδραση στην βιοδραστικότητα των καρκινογόνων ουσιών [19],[20],[21],[22]. Πιο συγκεκριμένα, αρκετές πολυφαινόλες όπως τα φλαβονοειδή (κερκετίνη, καιμφερόλη, γαλανγίνη, απιγενίνη, ναριγκίνη) μπορούν να αναστείλουν ένζυμα του κυτοχρώματος P450 που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση καρκινογόνων παραγόντων στον άνθρωπο, όπως οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες και οι ετεροκυκλικές αμίνες. Όσον αφορά την ομάδα των τερπενίων, τα καροτενοειδή, τα λιμονοειδή και οι φυτοστερόλες εμφανίζουν δράση έναντι της καρκινογένεσης. Πειραματικά μοντέλα και κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα καροτενοειδή μπορούν να αποτελέσουν παράγοντες θεραπείας ή προφύλαξης του καρκίνου. Ενώ σχετικά με την ομάδα των αζωτούχων ενώσεων έχει αποδειχτεί ότι ενώσεις όπως τα αλκαλοειδή εμφανίζουν χημειοθεραπευτική δράση έναντι του καρκίνου. Χαρακτηριστικά παραδείγματα της τάσης αυτής αποτελούν η καψαΐκίνη, πιπεριδίνη, η τζιντζερόλη και η παραδόλη. Για παράδειγμα, μελέτες σε ζώα έχουν δείξει ότι η καψαΐκίνη

αναστέλλει την αρυλδρογονανθρακική υδροξυλάση, ένζυμο υπεύθυνο για τον μεταβολισμό των καρκινογόνων πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων. Επίσης βρέθηκε ότι καταστέλλει το μεταβολισμό και την ομοιοπολική σύνδεση του DNA με καρκινογόνους παράγοντες όπως το βενζο[α]πυρένιο και την αφλατοξίνη B1[23],[24],[25]

- Αντιαγγειογενετική δράση

Αρκετές φυσικής προέλευσης πολυφαινόλες και μονοτερπένια έχει αναφερθεί ότι διαθέτουν την ικανότητα να δρουν ως αναστολείς της αγγειογένεσης για την ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων, με επακόλουθο να παρεμποδίζουν και την ανάπτυξη των καρκινικών όγκων στα ζώα. Για παράδειγμα, η *trans*-ρεοβρατρύλη καταστέλλει την *in vivo* αγγειογένεση που επάγεται από τους παράγοντες FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2) και VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), ενώ αναστέλλει άμεσα τον *in vitro* πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και τη μετάσταση των καρκινικών όγκων.

Αντίστοιχα, η κερκετίνη είναι μια πολυφαινόλη με αντίστοιχες βιολογικές ιδιότητες με την *trans*-ρεοβρατρύλη, σε μεγαλύτερες όμως συγκεντρώσεις [26],[27],[28],[29].

2 ΦΥΤΑ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΧΛΩΡΙΔΑΣ ΩΣ ΠΗΓΕΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Η Ελλάδα κατέχει εξέχουσα θέση στη λίστα των χωρών με ιδιαίτερη βιοποικιλότητα όχι μόνο συγκριτικά με άλλες ευρωπαϊκές χώρες αλλά σε παγκόσμια κλίμακα. Εντάσσεται στην ομάδα των χωρών της λεκάνης της Μεσογείου που είναι διεθνώς αναγνωρισμένες ως περιοχές αιχμής, οι λεγόμενες hot spots regions. Διακρίνεται από μεγάλη ποικιλία χερσαίων αλλά και θαλάσσιων οργανισμών, ενώ πραγματικά εντυπωσιακός είναι ο αριθμός των ενδημικών φυτών που ευδοκίμούν σε αυτή, μεγάλο ποσοστό των οποίων έχουν θεωρηθεί ως φαρμακευτικά φυτά. Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία μελετούνται κλάσματα εκχυλισμάτων μέρους των φυτών αυτών της ελληνικής χλωρίδας. Σε προηγούμενη εργασία των ερευνητών του ιδρύματος "Θώραξ" αναλύθηκε μια μοναδική βιβλιοθήκη από εκχυλίσματα φυτών της ελληνικής χλωρίδας σε σχέση με την ικανότητά τους να επηρεάζουν την αγγειογένεση και βρέθηκε ότι τα εν λόγω εκχυλίσματα παρουσίασαν κάποια επίδραση σε αυτήν. Τα κλάσματα αυτά συμβολίζονται με αριθμούς από 1-113, ενώ τα εκχυλίσματα με ένα κωδικό. Στον παρακάτω πίνακα θα παρουσιαστούν συνοπτικά οι κωδικοί αυτοί, το φυτό στο οποίο αντιστοιχούν, η οικογένεια στην οποία ανήκει το κάθε φυτό αλλά και από ποιο μέρος του φυτού το εκχύλισμα λαμβάνεται.

Πίνακας 2.1 Συμβολισμός μελετώμενων κλασμάτων, ονομασίες των συγκεκριμένων φυτών αλλά και η οικογένεια στην οποία ανήκουν.

Κωδικός ANGext	Ονομασία φυτού	Οικογένεια	Μέρος φυτού
ANGext2A	<i>Asphodeline lutea</i>	Liliaceae	ρίζωμα
ANGext9A	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Leguminosae	ρίζες
ANGext12A	<i>Nepeta orphanidea</i> var. <i>parnidea</i>	Labiatae	ανθισμένα υπέργεια μέρη
ANGext13A	<i>Onobrychis ebenedes</i>	Leguminosae	Ολόκληρο το φυτό
ANGext16A	<i>Salvia argentea</i>	Labiatae	ρίζες
ANGext27A	<i>Amelanchier parviflora</i> subsp. <i>chelmea</i>	Rosaceae	Ολόκληρο το φυτό
ANGext32A	<i>Daphne oleoides</i>	Thymelaeaceae	Ολόκληρο το φυτό
ANGext34A	<i>Inula pseudolimonella</i>	Compositae	Ολόκληρο το φυτό
ANGext147A	<i>Bupleurum fruticosum</i>	Umbeliferae	Ολόκληρο το φυτό
ANGext152A	<i>Laserpitium pseudomeum</i>	Umbelliferae	Ολόκληρο το φυτό

Τα εξεταζόμενα κλάσματα, όπως και τα εκχυλίσματα από τα οποία προέρχονται λαμβάνονται έτοιμα από την Φαρμακευτική Σχολή Αθηνών. Τα φυτά από τα οποία λαμβάνονται τα εκχυλίσματα και τα κλάσματα με την σειρά τους, είναι άγνωστα για το ευρύ κοινό και το μεγαλύτερο μέρος τους εξετάζεται για πρώτη φορά. Επομένως δεν έχει γίνει η αποκωδικοποίηση των περιεχομένων ενώσεων τους, ούτε και των μηχανισμών δράσης των περιεχομένων μεταβολιτών τους, παρόλα αυτά είναι γνωστό ότι τα εκχυλίσματα αυτά έχουν κάποια επίδραση στην αγγειογένεση και ενδέχεται και τα εξεταζόμενα κλάσματα να παρουσιάσουν. Η αδυναμία εξέτασης αυτών των εκχυλισμάτων οδήγησε στην πραγματοποίηση της παρούσας βιβλιογραφικής έρευνας, στην οποία παρουσιάζονται μερικά από τα κυριότερα χαρακτηριστικά, των μη ευρέως γνωστών, αυτών φυτών. Επίσης, παραθέτονται οι χαρακτηριστικές ενώσεις που έχουν βρεθεί μετά από φυτοχημικές αναλύσεις που έχουν πραγματοποιηθεί είτε σε εκχυλίσματα είτε σε αιθέρια έλαια που προέρχονται από τα συγκεκριμένα φυτά.

- **Asphodeline lutea (Κίτρινο ασφόδελος)**

Ο Ασφόδελος (Asphodeline) είναι ένα πολυετές, βολβώδες, ενδημικό φυτό της οικογένειας

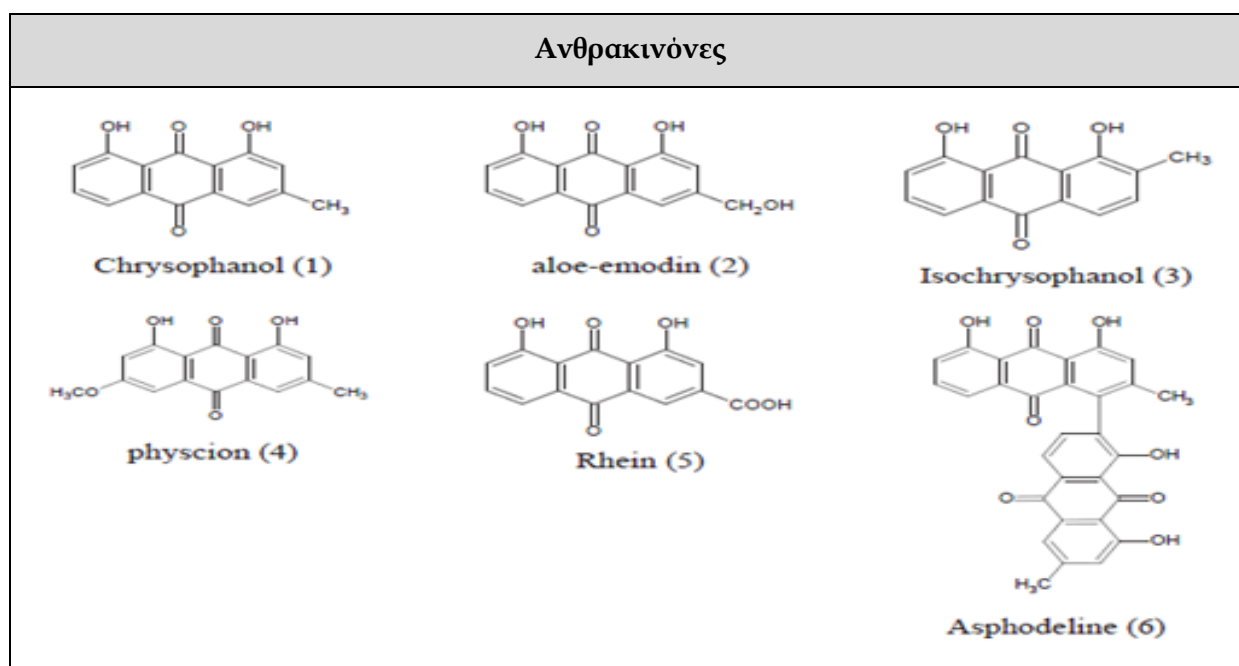


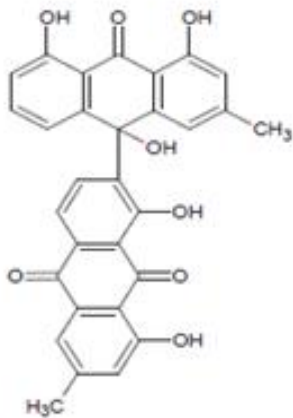
Εικόνα 2.1 Εικόνα Ashpodeline lutea

των λιλειδών (Liliaceae) που αναπτύσσεται στην Κεντρική και Νότια Ευρώπη. Πάνω από 12 είδη του φυτού βρίσκονται διασκορπισμένα από την Μεσόγειο ως την Ινδία, ενώ 5 από αυτά βρίσκονται και στην Ελλάδα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζει η Κίτρινη Ασφοδελίνα ή (Ashpodeline lutea). Φυτρώνει στις περιοχές της Ανατολικής Μεσογείου πιο συγκεκριμένα στο νησί της Ρόδου, στα λοιπά νησιά της Δωδεκανήσου και στην Κρήτη αλλά και στην Βόρειο Ελλάδα, Κιλκίς και αλλού. Ανθίζει την άνοιξη, (Μάρτιος-Απρίλιος) και έχει λεπτούς βλαστούς, οι οποίοι φθάνουν σε ύψος το 1,50 m, λεπτά και βραχέα φύλλα και κίτρινα άνθη. Το εντυπωσιακό με το άνθος του φυτού

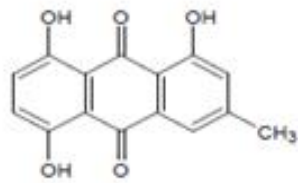
είναι η αντίθετη κατεύθυνση (προς τα επάνω) των τριών πετάλων και (προς τα κάτω) του ενός πετάλου και των αναπαραγωγικών οργάνων του φυτού. Όσον αφορά τις χαρακτηριστικές ενώσεις από τις οποίες αποτελείται αυτό το φυτό, πρόσφατα βρέθηκε ότι αποτελούνται από αρκετές ομάδες των δευτερογενών μεταβολιτών που έχουν ελπιδοφόρα βιολογική δράση όπως είναι οι: ανθρακινόνες, τα φλαβονοειδή και οι βενζόλιο/ ναφθαλίνες [30]. Στοιχεία σχετικά με τη βιολογική δραστηριότητα και την ιατρική χρήση της A. lutea δεν είναι διαθέσιμα. Ωστόσο, η χρήση των εδώδιμων ριζών, βλαστών, και ανθών έχουν αναφερθεί [31].

Παρακάτω παρουσιάζονται οι κύριες ενώσεις αυτών των ομάδων :

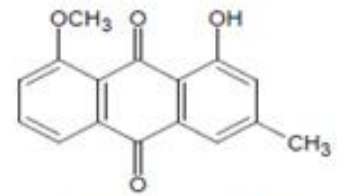




1,1',8,8',10-pentahydroxy-
3,3'-dimethyl-10,7'-bian-
thracene-9,9',10'-trione (7)

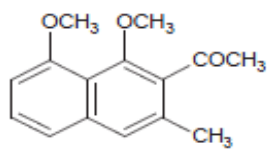


1,5,8-trihydroxy-3-methyl-
anthraquinone (8)

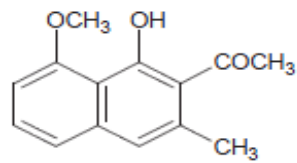


1-hydroxy-8-methoxy-3-
methylanthraquinone (9)

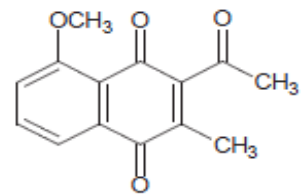
Βενζόλιο/ναφθαλινα



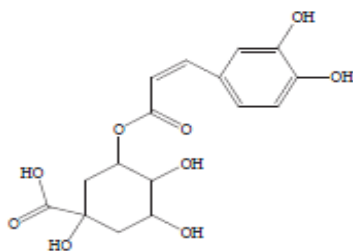
2-acetyl-1,8-dimethoxy-
3-methylnaphthalene (10)



and 2-acetyl-1-hydroxy-
8-methoxy-3-methylnaph-
thalene (11)

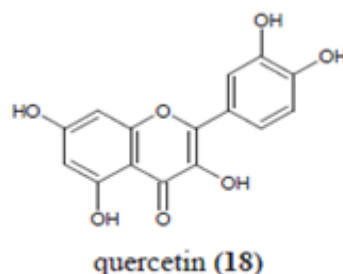
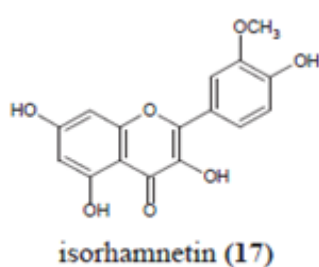
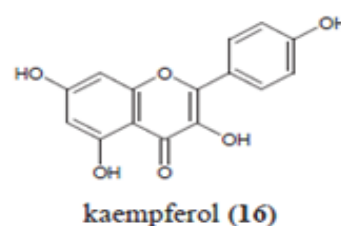
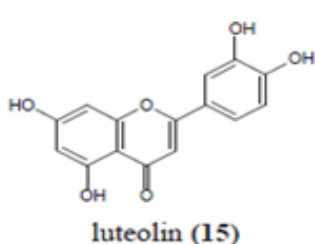
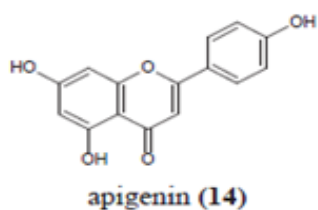


2-acetyl-8-methoxy-
3-methylnaphthoquinone
(12)



chlorogenic acid (13)

Φλαβονοειδή



- **Glycyrrhiza glabra end node**

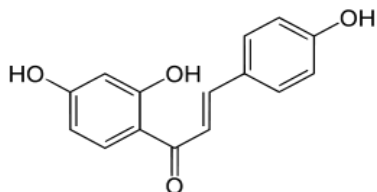
Η γλυκόριζα (*Glycyrrhiza glabra*) είναι πολυετές φυτό της εύκρατης ζώνης. Ανήκει στην οικογένεια των Leguminosae. Φύεται από μόνο του στην Ελλάδα, κυρίως στην Μακεδονία, στην Σάμο, την Κεφαλονιά κ.α, στην Ισπανία, στη Μικρά Ασία και στη νότια Ρωσία. Είναι θάμνος ύψους 50-100 cm, με ρίζες που φτάνουν τα 1-2m, κυλινδρικές, διακλαδισμένες και σαρκώδεις. Οι βλαστοί του φυτού είναι όρθιοι, ραβδωτοί, ισχυροί και χνουδωτοί. Είναι ένα φυτό με μεγάλη ιστορία στη λαϊκή θεραπευτική, ενώ στις μέρες μας βρίσκει ποικίλες χρήσεις λόγω των αξιολογών βιολογικών ιδιοτήτων της [32]. Μελέτες που έχουν γίνει κατά καιρούς έχουν δείξει ότι τα εκχυλίσματα και οι μεταβολίτες του φυτού παρουσιάζουν ποικίλες δράσεις, όπως: αντιβηχικές, αποχρεμπτικές, αντιπηκτικές, αντιμικροβιακές, αντι-υικές, οιστρογόνο-νικές, αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις, δράσεις κατά του έλκους και του διαβήτη, ηπατοπροστατευτικές και αντικαρκινικές [33]. Ο ποιοτικός έλεγχος των εκχυλισμάτων γλυκόριζας έδειξε την ύπαρξη πολυφαινωλικών ενώσεων, τερπενίων, λιπαρών οξέων κ.α. Παρακάτω παρουσιάζονται οι κυριότερες ομάδες αυτών των ενώσεων και μερικές από τις χαρακτηριστικές ουσίες που έχουν απομονωθεί.



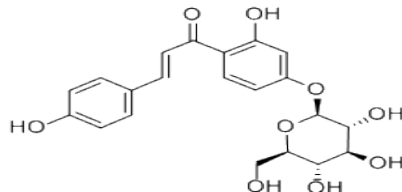
Εικόνα 2.2 *Glycyrrhiza glabra*

Πολυφαινολικές ενώσεις

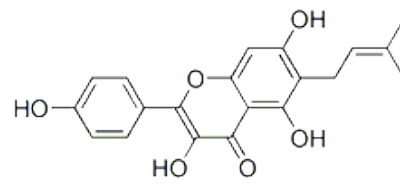
• Φλαβονοειδή



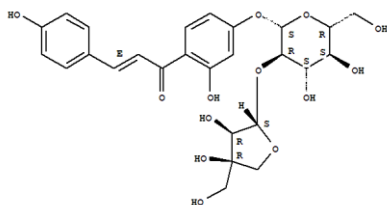
Isoliquiritigenin



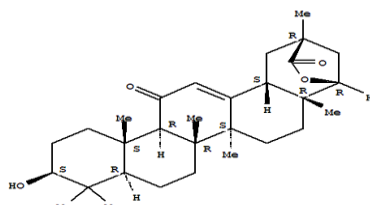
Neoisoliquiritin



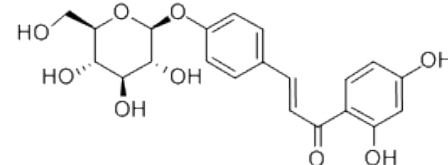
Licoflavonol



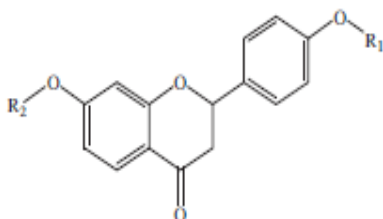
Licuraside



Glabrolide



Isoliquiritin

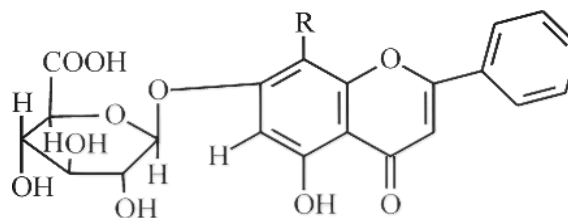


Liquiritin, R1= glucoside, R2=H

Liquiritin apioside, R1= glu-api, R2=H

Neoliquiritin, R1=H, R2= glucoside

Liquiritigenin, R1= R2=H

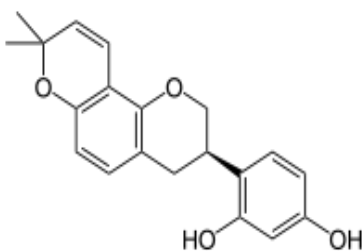


1 R = OH; 2 R = OCH₃

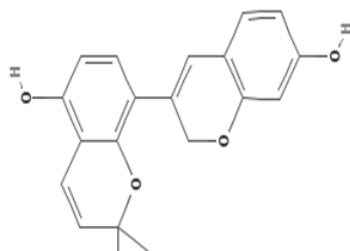
[1]5,8-dihydroxy-flavone-7-O-b-D-glucuronide

[2]5-hydroxy-8-methoxyflavone-7-O-b-D-glucuronide

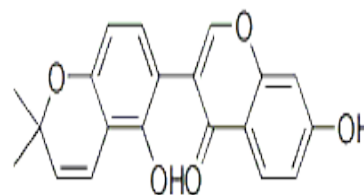
• Ισοφλαβόνες



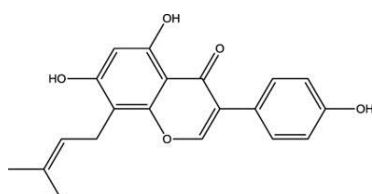
Glabridin



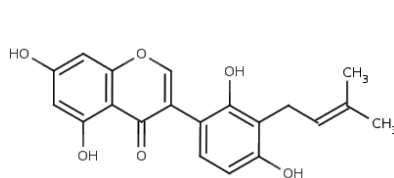
Galbrene



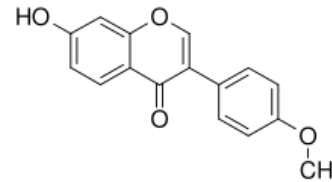
Glabrone



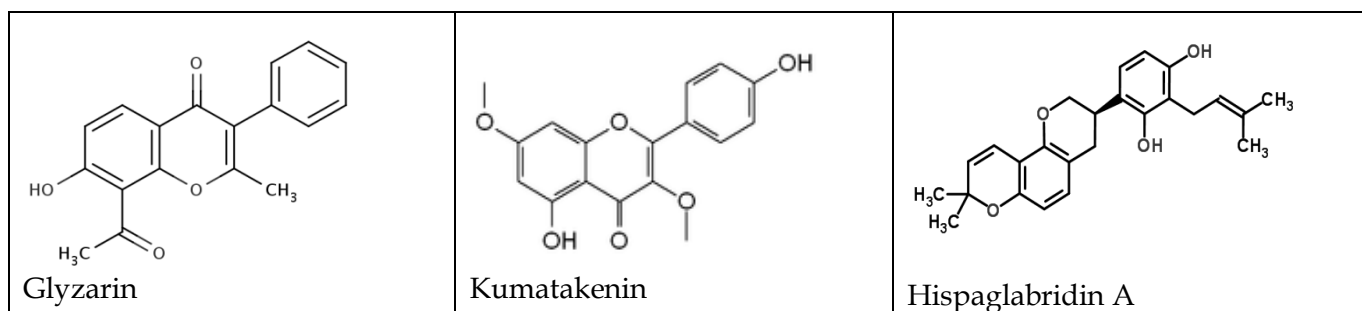
shinpterocarpin



Licoisoflavones A



Formononetin



[33],[34],[35]

- **Nepeta orphanidea**

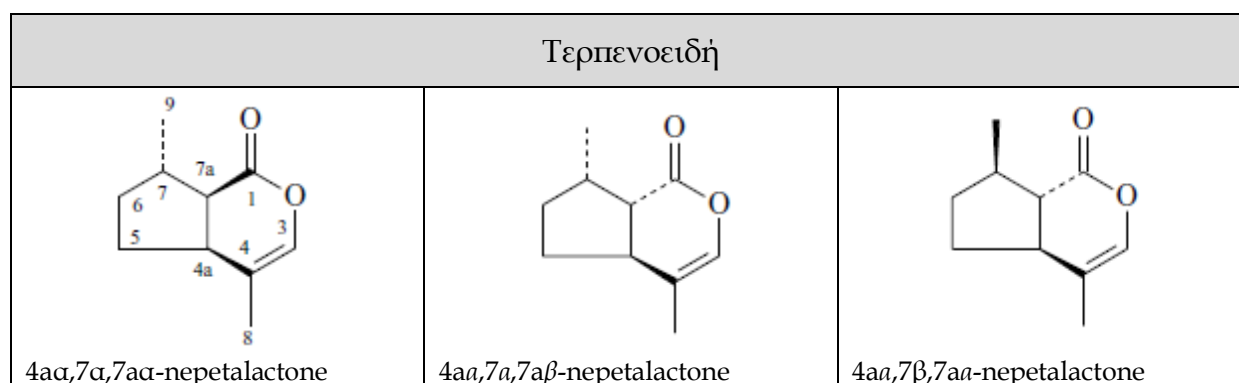
Η *Nepeta orphanidea* είναι ένα αρωματικό, ενδημικό, πολυετές φυτό που ανήκει στο γένος *Nepeta* L. και στην εβραία οικογένεια *Lamiaceae*. Αποτελείται από χοντρούς, γερούς μίσχους και μωβ-μπλε άνθη, τα οποία ανθίζουν την περίοδο Ιουλίου – Οκτωβρίου. Φυτρώνει κυρίως στην Ελλάδα και την Νότια Αλβανία σε ξυρούς, πετρώδεις ή βραχώδεις βιοτόπους και σε λοφοπλαγιές. Όσον αφορά την Ελλάδα, αυτό συναντάτε στην κεντρική Ελλάδα (Παρνασσός) και στην Πελοπόννησο (όρος Χελμός).

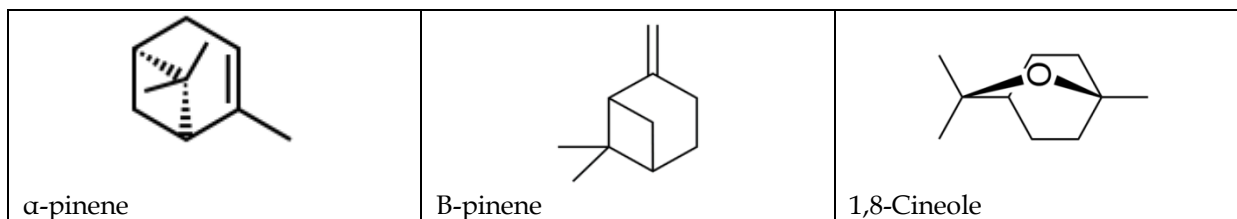


Εικόνα 2.3 *Nepeta orphanidea*

Εφόσον μετά από βιβλιογραφική έρευνα δεν βρέθηκαν αναφορές σχετικά με την *Nepeta orphanidea* και λόγω του ότι μια προηγούμενη ονομασία του φυτού αυτού είναι *Nepeta laconica/nepeta parnassica-var.orphanidea*, η βιβλιογραφική αναζήτηση επικεντρώθηκε σε αναφορές που σχετίζονται με την *nepeta parnassica*. Μετά από φυτοχημικές αναλύσεις

βρέθηκε ότι η μεγαλύτερη και κυριότερη κατηγορία ενώσεων που βρέθηκαν σε αυτά τα φυτά είναι τα τερπενοειδή. Παρακάτω παρουσιάζονται μερικές από τις χαρακτηριστικές ενώσεις τους [36],[37].



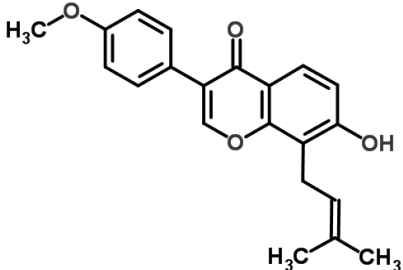
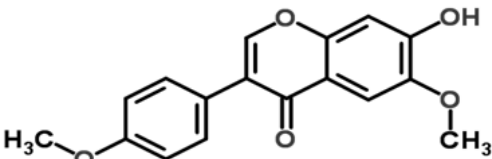
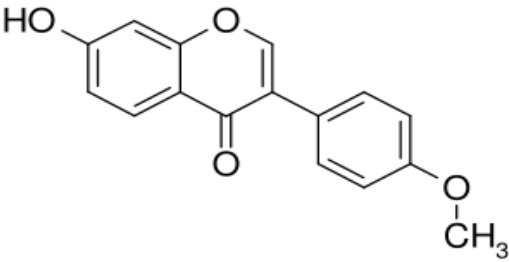
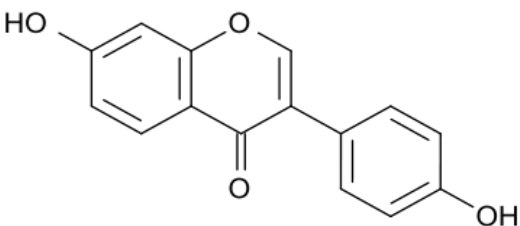


- **Onobrychis ebenoides / Ονοβρυχis η εβανοειδής**

Η *Onobrychis ebenoides* είναι ένα ενδημικό φυτό που ανήκει στο γένος των *Onobrychis* και στην οικογένειας των *Leguminosae*. Εντοπίζεται κυρίως στην Κεντρική και Νότια Ελλάδα. Έχει άνθη με απαλό ροζ χρώμα, τα οποία ανθίζουν συνήθως μεταξύ Ιουνίου και Σεπτεμβρίου και περοειδής φύλλα. Οι βιβλιογραφικές αναφορές για το συγκεκριμένο φυτό είναι ελάχιστες, παρόλα αυτά, φυτοχημικές αναλύσεις εκχυλισματος της *Onobrychis ebenoides* έδειξαν την παρουσία πολυφαινωλικών ενώσεων με κύρια κατηγορία τα φλαβονοειδή και πιο συγκεκριμένα ισοφλαβονοειδή [38]. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται μερικές από αυτές τις χαρακτηριστικές ενώσεις.



Εικόνα 2.4 *Onobrychis ebenoides*

Φλαβονοειδή	
 <p>Ebenosin</p>	 <p>Afrormosin</p>
 <p>Formononetin</p>	 <p>Daidzein</p>

- Salvia argentea

Salvia argentea(Silver Sage, Silver Salvia, Silver Clary) είναι ένα διετές ή βραχύβιο πολυετές

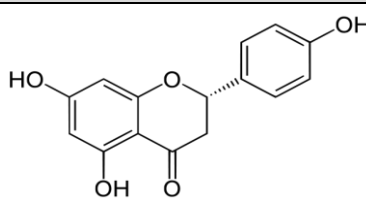
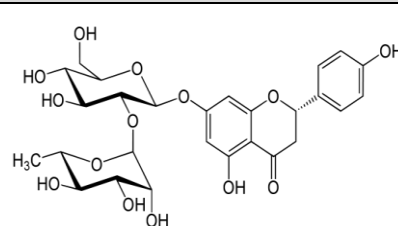
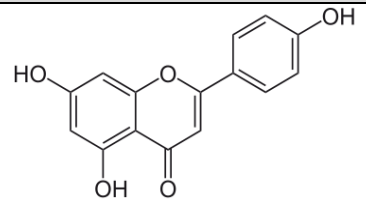
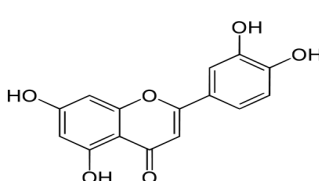
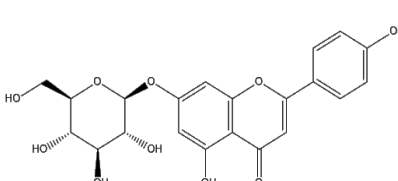
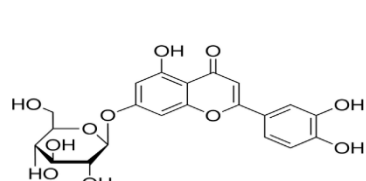
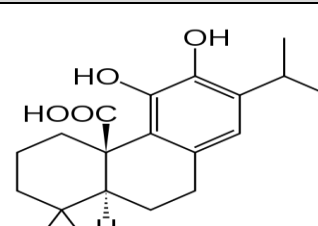
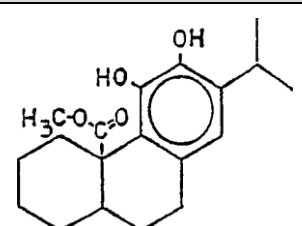


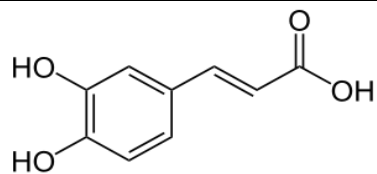
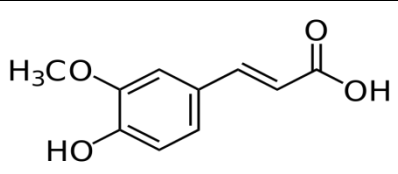
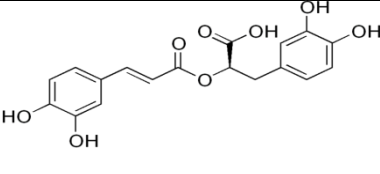
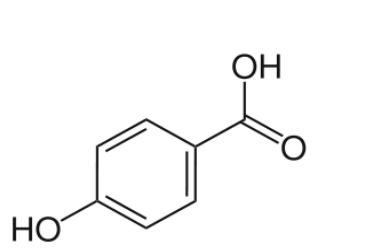
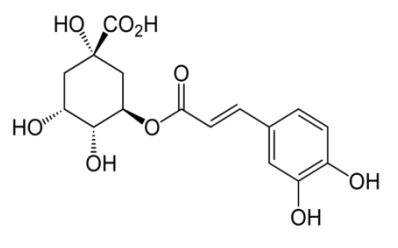
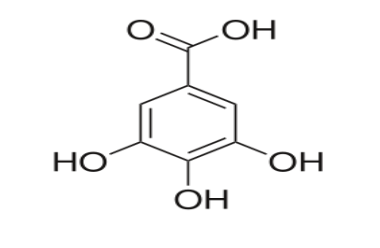
Εικόνα 2.5 Salvia argentea

φυτό, το οποίο ανήκει το γένος Αγγειόσπερμων Δικότυλων φυτών της οικογένειας των Λαμιιδών ή Χειλανθών (Lamiaceae ή Labiatae). Φυτρώνει κυρίως σε περιοχές της νότιας Ευρώπης, από την Πορτογαλία προς τη Βουλγαρία. Χαρακτηριστικό του είναι το τριχωτό ασημένιο-γκρίζο χειμερινό του φύλλωμα, από το οποίο πήρε και την ονομασία του. Τα άνθη του είναι λευκά με κίτρινους ή ροζ χρωματισμούς, και εμφανίζονται την άνοιξη ή το καλοκαίρι.

Το φυτό αυτό, όπως και πολλά είδη της Salvia, έχουν εμπορικό ενδιαφέρον για τις φαρμακευτικές βιομηχανίες αλλά και των βιομηχανιών τροφίμων λόγω της παρουσίας πολλών φαινολικών ενώσεων

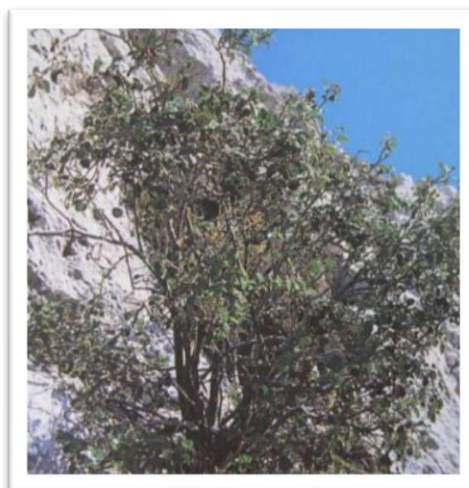
στα εκχυλίσματα τους, που ανήκουν κυρίως στις κατηγορίες των φαινολικών οξέων, φαινολικών γλυκοσίδων, φαινολικών διτερπενίων, φλαβονοειδών, ανθοκυάνων και κουμαρινών. Έρευνες για την Salvia argentea έχουν δείξει την παρουσία των παρακάτω ενώσεων [39],[40],[41].

Φλαβονοειδή		
		
Naringenin	Naringin	Apigenin
		
Luteolin	Apigenin-7- glucoside	Luteolin-7-O-glucoside
Φαινολικά διτερπένια		
		
Carnosic acid	Methyl carnosate	

Φαινολικά οξέα		
 <p>Caffeic acid</p>	 <p>Ferulic acid- φερουλικό οξύ</p>	 <p>Rosmarinic acid</p>
 <p>p-Hydroxybenzoic acid</p>	 <p>Chlorogenic acid</p>	 <p>Gallic acid</p>

- **Amelanchier parviflora ssp chelmea**

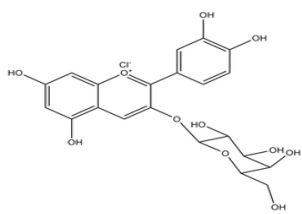
Amelanchier parviflora είναι ένας φυλλοβόλος θάμνος, ανήκει στο ευρύ γένος των Amelanchier της οικογένειας των Rosoideae. Χαρακτηρίζεται ως σπάνιο λόγω της σποραδικής του εμφάνισης σε μικρούς πληθυσμούς στην Ελληνική ενδοχώρα και τα νησιά. Το ύψος του φτάνει τα 2 m, έχει λευκωπά, χνοώδη κλαδιά, φύλλα 10-25 x 7-22 mm, ωοειδή έως ελαφρώς σφαιρικά, αποστρογγυλωμένα στην κορυφή με έντονο λευκωπό τρίχωμα και προεξέχουσες νευρώσεις στην κάτω επιφάνεια. Επίσης, έχει ερμαφρόδιτα άνθη με λευκά πέταλα, διπλάσια ή τριπλάσια σε μήκος σε σχέση με τα σέπαλα, τα οποία ανθίζουν το Μάιο ενώ οι σπόροι του ωριμάζουν τον Ιούλιο. Αναπτύσσεται σε ασβεστολιθικά πετρώματα, σε βραχώδεις θέσεις, σε ανοιχτά δάση και στις παρυφές τους, σε υψόμετρο 1100 - 1700 m. Όσον αφορά την γεωγραφική του εξάπλωση βρίσκεται κυρίως στην Τουρκία, ενώ στην Ελλάδα είναι διάσπαρτο στην Ελληνική ενδοχώρα, σε μερικά βουνά της Πελοποννήσου (Ταΰγετος, Χελμός, Κυλλήνη), της Στερεάς Ελλάδας (Πάρνηθα), της κεντρικής Εύβοιας και στη Ν. Γιούρα των Β. Σποράδων [42]. Μετά από βιβλιογραφική αναζήτηση διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχουν αναφορές που να σχετίζονται με το φυτοχημικό προφίλ του συγκεκριμένου φυτού. Παρόλα αυτά, για να παρουσιαστεί μια ενδεχόμενη γκάμα ενώσεων που μπορεί να υπάρχουν σε αυτό το φυτό εξετάστηκαν αναφορές που σχετίζονται με το ευρύ γένος των Amelanchier και με ένα φυτό το οποίο έχει παρόμοια βιολογική δράση με το Amelanchier parviflora το Amelanchier alnifolia. Παρακάτω παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι ομάδες των αντιπροσωπευτικών ενώσεων που ενδεχομένως υπάρχουν και στο εξεταζόμενο φυτό.



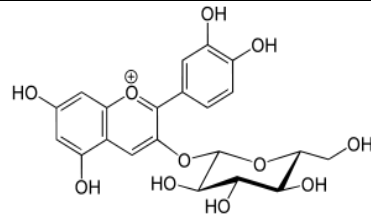
Εικόνα 2.6 Amelanchier parviflora

Φλαβονοειδή

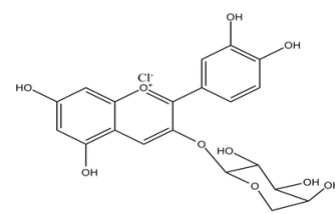
• Anthocyanins



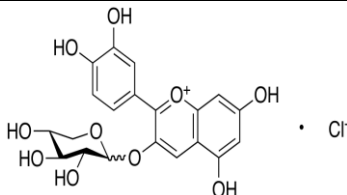
Cyanidin 3-O-galactoside



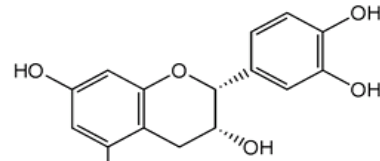
Cyanidin-3-O-glucoside



Cyanidin-3-O-arabinoside

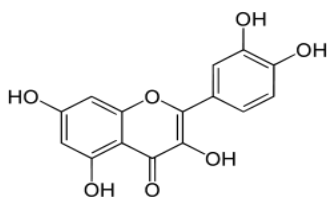


Cyanidin-3-O-xyloside

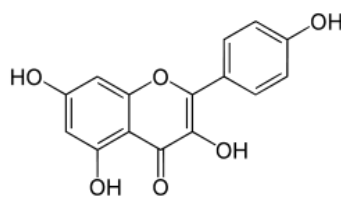


Proanthocyanidins

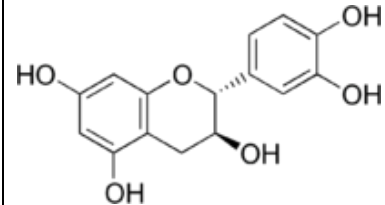
• Flavonol & flavan-3-ol



Quercetin



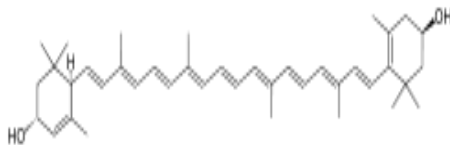
Kaempferol



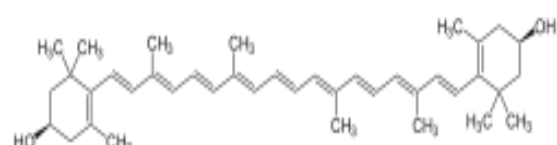
Catechin

Τερπενοειδή

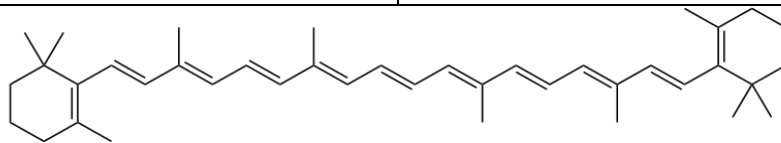
• Carotenoids



Lutein



Zeaxanthin



Beta-carotene

[43], [44], [45]

- **Daphne oleoides (Δάφνη η ελαιοειδής)**

Η Δάφνη η ελαιοειδής γνωστή και με τα κοινά ονόματα χαμοληά, ή λυκονουρά, ανήκει στην οικογένεια των thymelaeaceae και είναι ένας αιθαλής, νανώδης θάμνος ύψους 40 εκ. περίπου. Πρόκειται για έναν θάμνο με σαρκώδη, ωσειδή φύλλα και όμορφα λευκά, εύοσμα άνθη με 4 μακρείς οξύληκτους λοβούς που φύονται ανά 3 έως 6 σε επάκριες κεφαλιόμορφες δέσμες. Ανθίζει από Απρίλιο-Ιούλιο και φυτρώνει κυρίως σε αλπικές, ορεινές, βραχώδεις περιοχές, σε θαμνότοπους και ανοιχτά δάση. Είναι είδος αρκετά κοινό στην Στερεά Ελλάδα, Θεσσαλία, Μακεδονία και ειδικά στον Όλυμπο σε υψόμετρο κυρίως από 900μ.

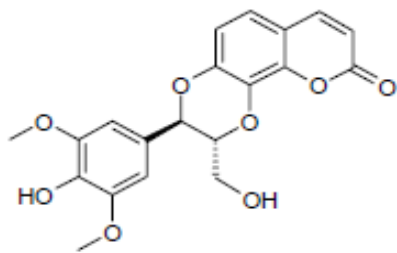


Εικόνα 2.7 Daphne oleoides

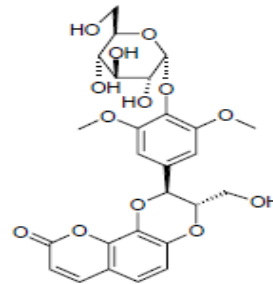
Μετά από βιβλιογραφική έρευνα διαπιστώθηκε ότι στο συγκεκριμένο φυτό υπάρχουν αρκετές ομάδες δευτερογενών μεταβολιτών. Παρακάτω παρουσιάζονται μερικές από αυτές τις ομάδες και οι αντίστοιχες χαρακτηριστικές ενώσεις που έχουν απομονωθεί από την Daphne oleoides [46],[47],[48].

Πολυφαινολικές ενώσεις	
• Λιγνάνες	
Wikstomol R=OH Matairesinol R=H	Eusedime
Lariciresinol R=CH ₃ Taxiresinol R=H	Daphneligin

• Coumarinolignoid

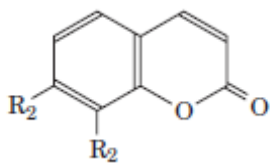


Daphneticin



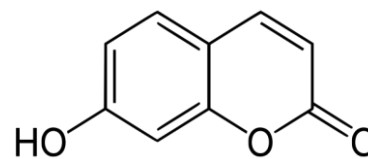
Daphneticin-4-O-a-D-glucopyranoside

• Κουμαρίνες



Daphnetin $R_1=R_2=OH$

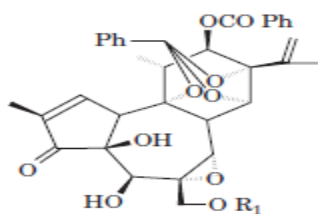
Daphnin $R_1=OH$ $R_2=O-Glc$



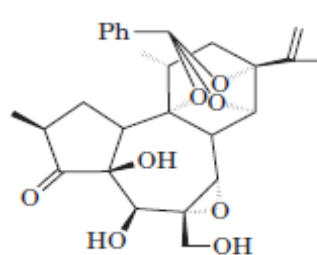
Umlellirone

Τερπενοειδή

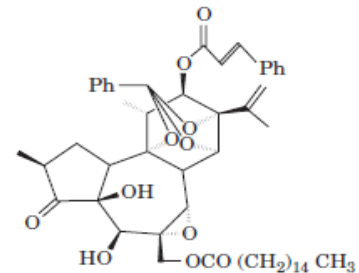
• Διτερπενοειδή



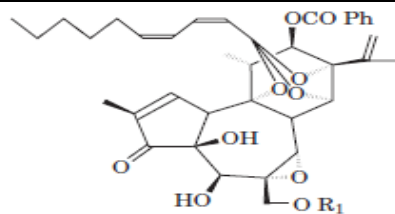
Genkwadaphnin $R_1: H$
genkwadaphnin-20-palmitate
 $R_1: CO-(CH_2)_{14}-CH_3$



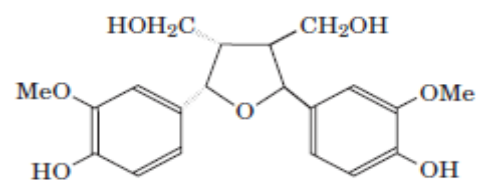
1,2-dehydrodaphnetoxin



Gnidicin-20-palmitate



Gnidilatin $R_1: H$
Gnidilatin-20-palmitate $R_1: CO-(CH_2)_{14}-CH_3$

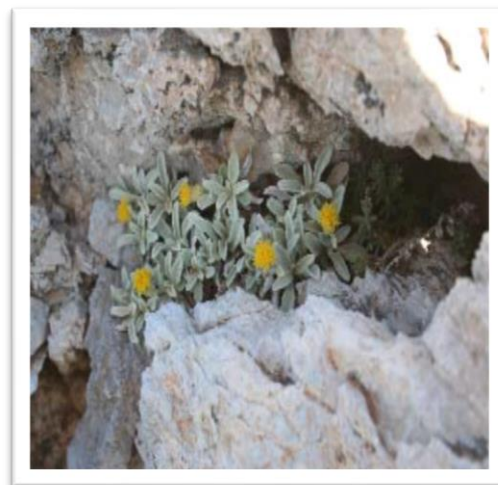


Eudesmine

- **Inula pseudolimonella (Rech.f.)**

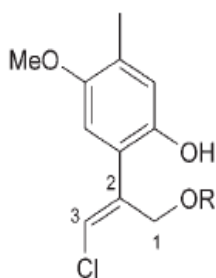
Η *Inula pseudolimonella* ένα πολυετές, ενδημικό θαμνώδες φυτό που ανήκει στην οικογένεια των Compositae και έχει κοινό όνομα Γκρεμόχορτο.

Το ύψος του κυμαίνεται από 10 έως 29 cm, έχει γαλαζοπράσινα και χνουδωτά φύλλα, λεπτούς βλαστούς και κίτρινα άνθη τα οποία ανθίζουν από Μάιο - Ιούνιο. Φυτρώνει σε ασβεστολιθικές απότομες πλευρές και βράχια της Ελλάδας, και ειδικά στην Ανατολική Κρήτη [49],[50]. Μετά από βιβλιογραφική έρευνα διαπιστώθηκε ότι το είδος *Inula pseudolimonella* δεν έχει μελετηθεί στο παρελθόν, οπότε για να υπάρξει μια γενική εικόνα για τις ενδεχόμενες ενώσεις από τις οποίες αποτελείται αυτό το φυτό, ερευνήθηκε το ευρύ γένος της *Inula*. Η βιβλιογραφία για το γένος αυτό είναι πιο πλούσια και δείχνει την παρουσία μεγάλης γκάμας ενώσεων. Συγκεκριμένα, έχουν βρεθεί ενώσεις που ανήκουν στις εξής κατηγορίες: μονοτερπένια, διτερπένια, σεσκιτερπένια, φλαβονοειδή, και ένα γλυκολιπίδιο [51]. Οι μοριακοί τύποι μερικών από αυτών των ενώσεων παρουσιάζονται παρακάτω:

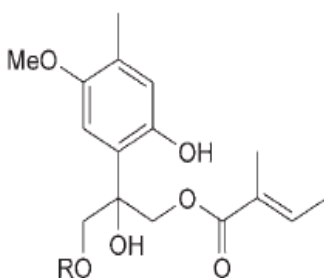


Εικόνα 2.8 *Inula pseudolimonella*

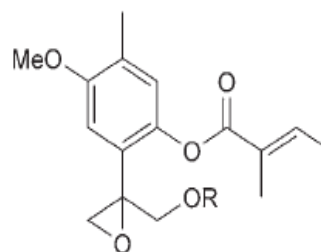
Μονοτερπένια



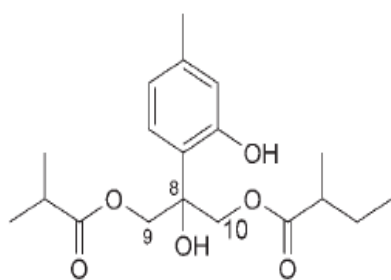
1 R = Ac
2 R = H



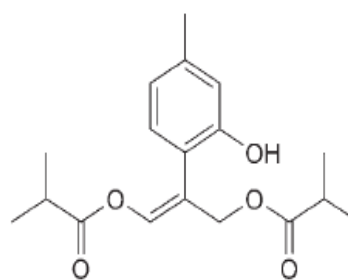
3 R = H
4 R = Ac



5 R = Me₂CHCH₂CO
6 R = Ac

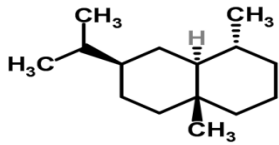


7

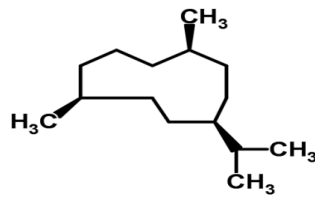


8

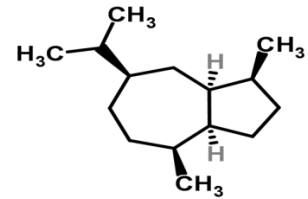
Κυκλικά σесκιτερπένια



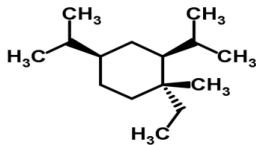
Eudesmane



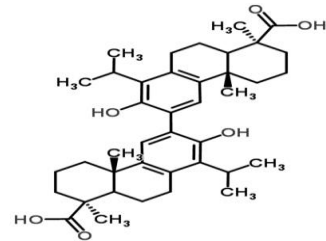
Germacrane



Guaiane

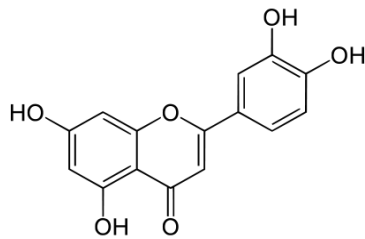


Elemene

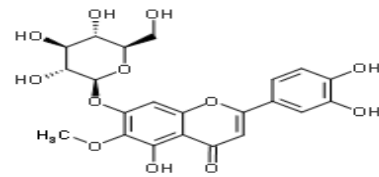


Macrophylic Acid

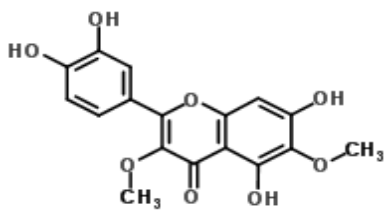
Φλαβονοειδή



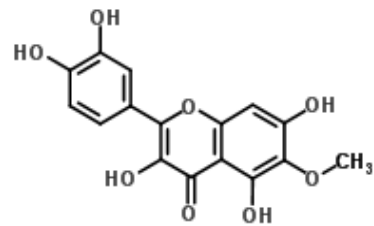
Luteolin



Nepitrin

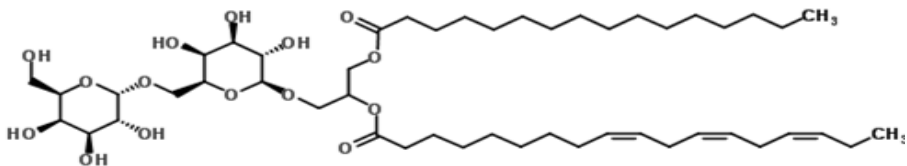


Axillarin



Patuletin

Γλυκολιπίδιο



Inugalactolipid A

- **Bupleurum fruticosum** (Βούπλευρο το θαμνώδες)

Το *Bupleurum fruticosum* είναι ένα μεσογειακό, αειθαλές, θαμνώδες φυτό. Ανήκει στο

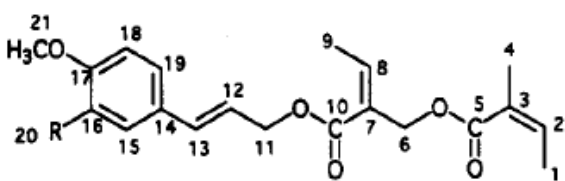
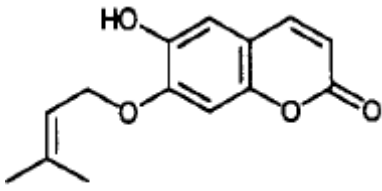
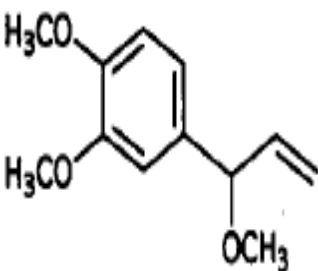
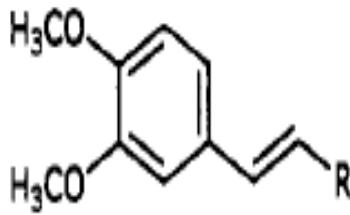


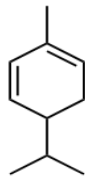
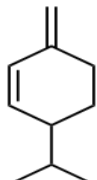
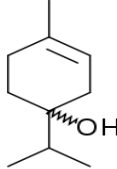
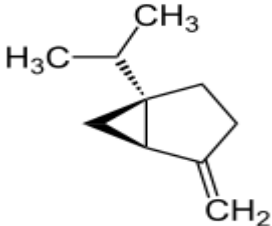
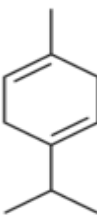
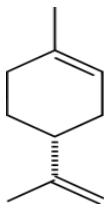
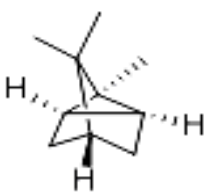
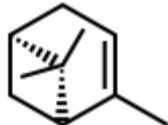
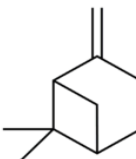
Εικόνα 2.9 Το *Bupleurum fruticosum*

γένος των *Bupleurum* της οικογένειας *ariaceae* (*umbelliferae*). Όσον αφορά την γεωγραφική του εξάπλωση, είναι τυπικό φυτό των περιοχών της μεσογείου. Στην Ελλάδα συναντάτε στην Στερεά Ελλάδα, Νησιά Ιονίου, Βόρεια Ανατολική Ελλάδα, Βόρεια Κεντρική Ελλάδα, Ανατολική Κεντρική Ελλάδα, Πελοπόννησος, Πάρνηθα και έχει ευρεία εξάπλωση σε θαμνώδεις περιοχές και πετρώδεις θαμνότοπους σε μέσα υψόμετρα (<900m). Χαρακτηρίζεται από πράσινο-μπλε φύλλωμα και κίτρινα άνθη τα οποία ανθίζουν το καλοκαίρι [52]. Όσον αφορά

τους δευτερογενής μεταβολίτες που μπορεί

να υπάρχουν στα εκχυλίσματα αυτού του φυτού, μετά από βιβλιογραφική αναζήτηση βρέθηκε ότι οι κύριες κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών είναι τα φαινυλοπροπανοειδή και τα τερπενοειδή. Παρακάτω παρουσιάζονται και οι πιο χαρακτηριστικές ενώσεις που περιλαμβάνονται σε αυτές τις ομάδες [53].

Φαινυλοπροπανοειδή	
 <p>phenylpropanoids, (E-3-(3,4 dimethoxyphenyl) -2-propen-yl)(Z)-2-[(Z)-2-methyl-2-butenoyloxymethyl) butenoate R=OCH₃ phenylpropanoids, (E-3-(3,4 methoxyphenyl) -2-propen-yl)(Z)-2-[(Z)-2-methyl-2-butenoyloxymethyl) butenoate R=H</p>	 <p>7-(3,3-dimethylallyloxy)-6-hydroxycoumarin (prenyletin)</p>
 <p>1,2-Dimethoxy-4-(1-methoxy-2-propenyl) benzene</p>	 <p>1,2-dimethoxy-4-(3-methoxy-1-propenyl) benzene R=CH₂OCH₃ 3,4-dimethoxycinnamaldehyde R=CHO</p>

Τερπενοειδή		
• Μονοτερπενοειδή		
		
<chem>CC(C)C1=CC=C(C)CC1</chem> α-phellandrene	<chem>CC(C)C1=CC=CC1=C</chem> β-phellandrene	<chem>CC(C)C1=CC(O)CC1</chem> Terpinen-4-ol
		
<chem>CC12C=CC1(C)C2</chem> Sabinene	<chem>CC(C)C1=CC=CC1=C</chem> γ-terpinene	<chem>CC(C)=CC1=CC=CC1</chem> Limonene
		
<chem>CC12C=CC1(C)C2</chem> Ricyclene	<chem>CC12C=CC1(C)C2</chem> α-pinene	<chem>CC12C=CC1(C)C2</chem> β-pinene

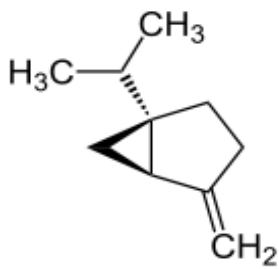
- **Laserpitium pseudomeum**

Η *Laserpitium pseudomeum* είναι ένα ενδημικό, πολυετές, ποώδες φυτό, με χαρακτηριστικό ύψος 25 cm, το οποίο ανήκει στην οικογένεια Apiaceae (Umbellifere) και φυτρώνει στην Ελλάδα. Πιο συγκεκριμένα όσον αφορά την γεωγραφική του κατανομή επεκτείνεται στην περιοχή της Νότιας Μεσογείου και στα βουνά της Κεντρικής και Νότιας Ελλάδας αντίστοιχα [54]. Μετά από εκτενή βιβλιογραφική έρευνα διαπιστώθηκε ότι για το γένος *Laserpitium* έχουν γίνει ελάχιστες δημοσιεύσεις, ενώ το είδος *Laserpitium pseudomeum* δεν είναι ευρύ γνωστό για πολλούς. Όσον αφορά τις χαρακτηριστικές ενώσεις του φυτού αυτού, βασιζόμενη σε μια μόνο δημοσίευση, βρέθηκε ότι ανήκουν στην ομάδα των τερπενοειδών και παρουσιάζονται παρακάτω. Ενώ όσον αφορά τις φυτοχημικές αναλύσεις στο ευρύ γένος *Laserpitium* έδειξαν και την παρουσία οσεκίτερπενικών λακτονών [54]

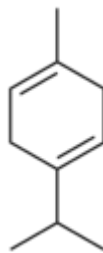


Εικόνα 2.10 *Laserpitium pseudomeum*

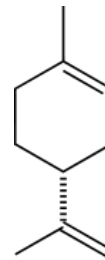
Τερπενοειδή



Sabinene



γ-terpinene

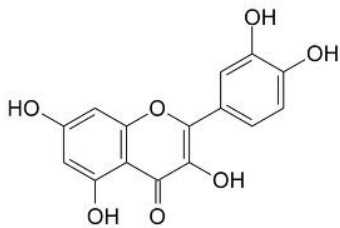
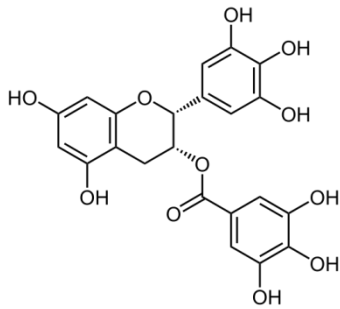
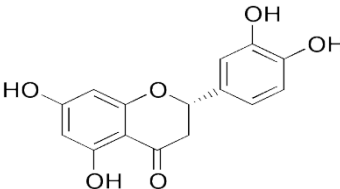


Limonene

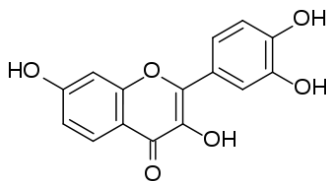
3 ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΕΣ ΦΥΣΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Στο δεύτερο σκέλος της διπλωματικής αυτής εργασίας εξετάζονται καθαρές απομονωμένες ενώσεις από φυσικά προϊόντα, οι οποίες χαρακτηρίζονται για τις χημειοπροφυλακτικές τους δράσεις (αντι-καρκινικές, αντι-αγγειογενετικές, αντι-οξειδωτικές και αντι-φλεγμονώδη δράση), γεγονός το οποίο τις καθιστά εξαιρετικά ενδιαφέρουσες από ερευνητικής σκοπιάς. Παρακάτω παρουσιάζεται ένας συγκεντρωτικός πίνακας με τα κυριότερα χαρακτηριστικά αυτών των ενώσεων.

Πίνακας 3.1 Κυριότερα χαρακτηριστικά εξεταζόμενων φυσικών ενώσεων

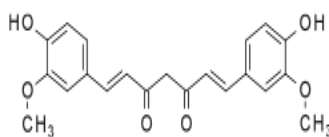
Φυσικές ενώσεις	Χημικός Τύπος	Χαρακτηριστικά φυσικών Ενώσεων
Κερκετίνη		Η κερκετίνη είναι ένα αντιοξειδωτικό, της οικογένειας των φλαβονοειδών και πιο συγκεκριμένα των φλαβονολών. Πλούσιες πηγές της συγκεκριμένης ένωσης είναι τα κρεμμύδια, το κόκκινο κρασί και το πράσινο τσάι. Στο μόριό της έχει 3 δακτυλίους και 5 υδροξυλικές ομάδες [56].
Το γαλλικό άλας της επιγαλλοκατεχίνης (EGCG)		Το γαλλικό άλας της επιγαλλοκατεχίνης (EGCG) είναι μια κατεχίνη, που χημικά ανήκει στην ομάδα των φλαβονοειδών. Αποτελεί το κύριο συστατικό του πράσινου τσαγιού και πιο συγκεκριμένα, το 30-40% του ξηρού υπολείμματος των φύλλων του τσαγιού, ενώ είναι υπεύθυνη για την αντιοξειδωτική δράση του φυτού, για τις αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιμικροβιακές ιδιότητες, σύμφωνα με έναν μεγάλο αριθμό μελετών σε ανθρώπους, πειραματόζωα και <i>in vitro</i> μελέτες [57].
Εριοδικτυόλη		Η εριοδικτυόλη είναι ένα αντιοξειδωτικό, της οικογένειας των φλαβονοειδών και πιο συγκεκριμένα των φλαβονολών. Τα λεμόνια είναι η κύρια πηγή της, παρόλα αυτά συναντάται και σε πολλά βότανα [58].

Φισετίνη

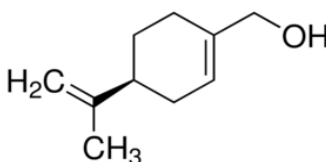


Η φισετίνη ανήκει στην ομάδα των φλαβονοειδών, είναι μια φλαβανόλη η οποία συναντάται σε πολλά φυτά. Πιθανές αντι-γήραντικές, αντι-φλεγμονώδεις, αντι-καρκινικές, και αντι-ιικές ιδιότητες της φισετίνης είναι υπό επιστημονική έρευνα [59].

Κουρκουμίνη

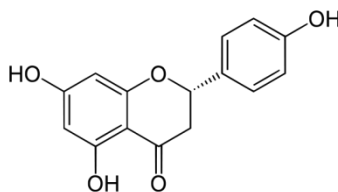


Η κουρκουμίνη είναι μία φυσική χρωστική ουσία και κυριότερο ενεργό συστατικό του καρυκεύματος κουρκουμάς. Ανήκει στην ομάδα των φαινολικών ενώσεων και έχει βρεθεί ότι εμφανίζει ισχυρή χημειοπροφυλακτική δράση, εκδηλώνοντας την δράση αυτή μέσω ποικίλων μηχανισμών [60].

Περιλλύλ αλκοόλη
(ΡΟΗ)

Η περιλλύλ αλκοόλη ανήκει στην ομάδα των μονοτερπενίων, απομονώνεται από τα αιθέρια έλαια της μέντας, του δυόσμου, των κερασιών, των σπόρων σέλινου, και διαφόρων άλλων φυτών. Η ένωση αυτή παρουσιάζει χημειοπροφυλακτική δράση [61].

Ναρινγενίνη

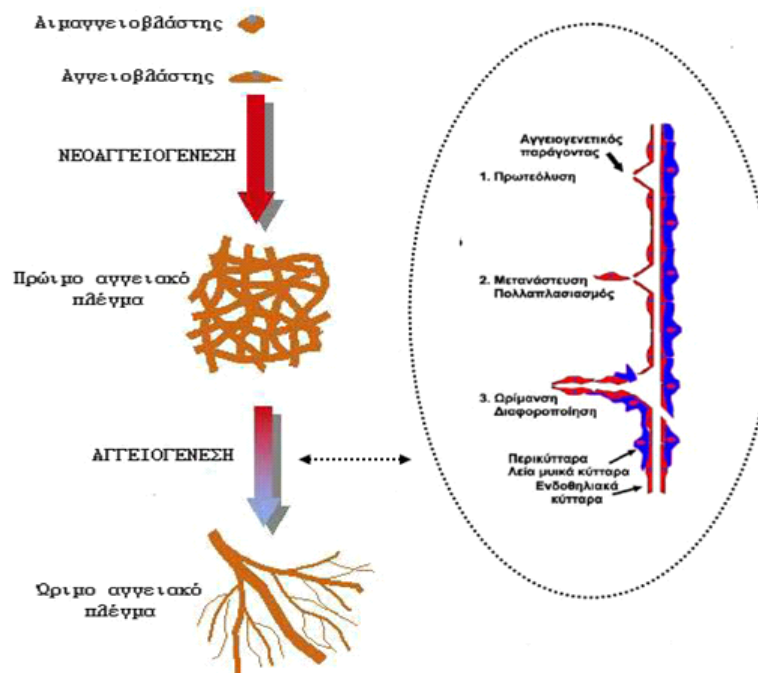


Η ναρινγενίνη είναι μία φλαβανόνη που θεωρείται ότι έχει βιοενεργή δράση στον ανθρώπινο οργανισμό. Είναι ένα αντιοξειδωτικό, εξολοθρευτής ελευθέρων ριζών, διαμορφωτής του ανοσοποιητικού συστήματος ο οποίος προάγει τον μεταβολισμό των υδατανθράκων. Επιστημονικές έρευνες έδειξαν ότι η ναρινγενίνη μειώνει την οξειδωτική ζημιά στο DNA. Η ναρινγενίνη βρίσκεται στα εσπεριδοειδή (πορτοκάλι, λεμόνι, περγαμόντο, κ.α.) [62].

4 ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

4.1 Γενικές πληροφορίες για την αγγειογένεση

Η **αγγειογένεση**, ορίζεται ως ο σχηματισμός νέων αγγείων από ήδη υπάρχοντα. Τα αιμοφόρα αγγεία αναπτύχθηκαν κατά την εξέλιξη για να μεταφέρουν οξυγόνο, θρεπτικά συστατικά καθώς και διάφορους παράγοντες απαραίτητους για την ανάπτυξη ή διατήρηση των διαφόρων τύπων ιστών στα απομακρυσμένα όργανα. Ως εκ τούτου, τα αγγεία είναι κρίσιμα για την ανάπτυξη των οργάνων στο έμβρυο και την επούλωση των τραυματισμένων ιστών στον ενήλικα. Γενικά, με τον όρο **αγγειογένεση** αναφερόμαστε σε δύο διαφορετικούς μηχανισμούς δημιουργίας και τύπων αγγείων (Εικόνα 4.1). Η αγγειογένεση, με την αυστηρή έννοια του όρου, περιγράφει την δημιουργία νέων αγγείων από προϋπάρχοντα λειτουργικά αγγεία. Από την άλλη, η νεοαγγειογένεση περιγράφει την διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων που οργανώνονται εν συνεχεία στα αγγεία [63].



Εικόνα 4.1 Σχηματική αναπαράσταση της νεοαγγειογένεσης, της δημιουργίας του αρχικού αγγειακού δικτύου και της αγγειογένεσης, δηλαδή της δημιουργίας νέων αγγείων από προϋπάρχοντα. Στη νεοαγγειογένεση, αγγειοβλαστικά αρχέγονα κύτταρα στα νεοσχηματιζόμενα όργανα, όπου βρίσκονται ως νησίδες, αναπτύσσονται σε ενδοθηλιακά και αιματοποιητικά κύτταρα. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα θα σχηματίσουν το πρόδρομο αγγειακό πλέγμα, το οποίο αναπτύσσεται και διαφοροποιείται περαιτέρω προκειμένου να σχηματίσει το ώριμο αγγειακό σύστημα. Η αγγειογένεση είναι δυνατόν να διακριθεί σε μια σειρά από διακριτές διαδικασίες.

4.2 Είδη αγγειογένεσης - Angiogenesis

Έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα δύο διαφορετικοί τρόποι αγγειογένεσης:

- Αγγειογένεση με εκβλάστηση (sprouting).
- Αγγειογένεση χωρίς εκβλάστηση (ονομάζεται επίσης και μικροαγγειακή ανάπτυξη με εγκολεασμό (splitting)).

Η μη εκβλαστική αγγειογένεση, που κυριαρχεί σε όργανα όπως οι πνεύμονες, μπορεί να συμβεί μέσω πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσα στο αγγείο, οπότε δημιουργείται ένας μεγάλος σε διάμετρο αυλός, ο οποίος μπορεί να διαιρεθεί σε τριχοειδή. Η αγγειογένεση με εκβλάστηση (που είναι και η πιο κοινή) αρχίζει με την απελευθέρωση αγγειογενετικών παραγόντων που ενεργοποιούν τα φυσιολογικά αδρανή ενδοθηλιακά κύτταρα. Η ενεργοποίηση αυτή των ενδοθηλιακών κυττάρων, από αγγειογενετικό ερέθισμα σηματοδοτεί την έναρξη μιας σειράς γεγονότων που οδηγούν στο σχηματισμό νέων αγγείων [64].

4.3 Η αγγειογενετική διαδικασία

Η διαδικασία του σχηματισμού νέων αγγείων συμβαίνει με μια συγκεκριμένη αλληλουχία σταδίων, πάντα με την ίδια σειρά, ανεξάρτητα από το αγγειογενετικό ερέθισμα (Εικόνα 4.2). Τα στάδια που συμμετέχουν και οδηγούν στην αγγειογένεση είναι τα εξής:

- 1) Ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων από ένα αγγειογενετικό ερέθισμα.
- 2) Αποικοδόμηση του εξωκυττάριου υλικού και της βασικής μεμβράνης των υπαρχόντων αιμοφόρων αγγείων από μεταλλοπρωτεάσες που εκκρίνονται από τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα.
- 3) Πολλαπλασιασμός, μετανάστευση, και ευθυγράμμιση των ενδοθηλιακών κυττάρων, ώστε να φτιάξουν σωληνοειδείς δομές που θα αποτελέσουν τον αυλό του νέου αγγείου.
- 4) Αναστόμωση των νέων τριχοειδών και έναρξη της αιματικής κυκλοφορίας.
- 5) Δημιουργία νέας βασικής μεμβράνης και συσσώρευση λείων μυϊκών κυττάρων και περικυττάρων προς το νεοσυντιθέμενο αγγείο [65].



Εικόνα 4.2 Τα διάφορα στάδια της αγγειογένεσης. Αγγειογενετικοί παράγοντες που απελευθερώνονται από τους παρακείμενους ιστούς (1,2) ενεργοποιούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα (3,4) επάγοντας τον πολλαπλασιασμό (5) και τη μετανάστευσή τους (6). Κατά την αναδιοργάνωση του εξωκυττάριου στρώματος σχηματίζονται πρώιμα αγγεία (7,8) τα οποία ενώνονται με τα προϋπάρχοντα αγγεία (9) και σταθεροποιούν τη δομή τους με την υποστήριξη άλλων κυττάρων (10).

4.4 Αγγειογένεση και ασθένειες που σχετίζονται με αυτήν

Η αγγειογένεση συμβαίνει σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Οι φυσιολογικές καταστάσεις στις οποίες λαμβάνει χώρα η αγγειογένεση είναι η ανάπτυξη των εμβρίων, στον αναπαραγωγικό κύκλο των γυναικών, στην ανάπτυξη των τριχών, στην επούλωση των τραυμάτων κ.τ.λ. Υπό αυτές τις φυσιολογικές συνθήκες υπάρχει ισορροπία μεταξύ ενδογενών ουσιών που προάγουν ή αναστέλλουν την αγγειογένεση (Πίνακας 4.1) [66].

Πίνακας 4.1 Παρουσίαση αναστολέων και επαγωγέων της αγγειογένεσης.

ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ	ΕΠΑΓΩΓΕΙΣ
ΑΙΤΕΙΟΣΤΑΤΙΝΗ	VEGF
ΕΝΔΟΣΤΑΤΙΝΗ	EGF
ΙΝΤΕΦΕΡΟΝΕΣ	bFGF
ΘΡΟΜΒΟΣΠΟΝΔΙΝΗ	aFGF
ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ (NO)	TNF
κ.τ.λ	ΘΡΟΜΒΙΝΗ

4.4.1 Αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου (VEGF)

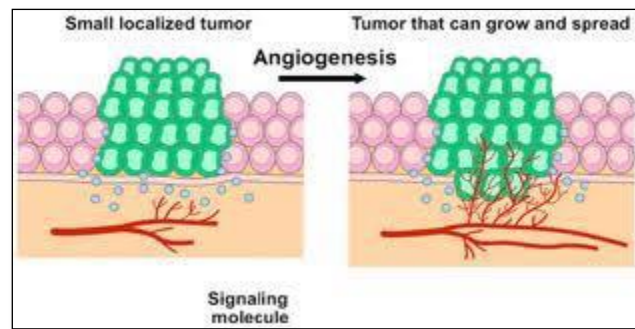
Μεταξύ των πολλών παραγόντων που εμπλέκονται στην αγγειογένεση, ο VEGF έχει προσδιοριστεί ως ο πιο ισχυρός και κυρίαρχος. Ο VEGF υποκινεί την ανάπτυξη, την επιβίωση, και τον πολλαπλασιασμό των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων. Όπως προκύπτει από προκλινικές μελέτες, ο παράγοντας VEGF έχει αποδειχθεί να διευκολύνει την επιβίωση των υπαρχόντων αγγείων, να συμβάλλει στις αγγειακές ανωμαλίες, που μπορούν να εμποδίσουν την αποτελεσματική παράδοση παραγόντων εναντίον των όγκων και να υποκινήσει την ανάπτυξη νέων αγγείων. Επίσης ο VEGF κατέχει έναν διπλό βασικό ρόλο, αφ' ενός είναι απαραίτητος στην αγγειογένεση κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και πιθανόν στις ασθένειες, και αφ' ετέρου είναι μία ισχυρή αγγειοπροστατευτική κυτταροκίνη υπεύθυνη για την ομοιοστάση των αγγειακών δικτύων. Τέλος ο παράγοντας αυτός είναι μέλος μιας οικογένειας 6 δομικά σχετικών πρωτεϊνών [VEGF-1 (ή VEGF-A), VEGF-2 (ή VEGF-C), VEGF-3 (ή VEGF-B), VEGF-D, VEGF-E] που ρυθμίζουν την ανάπτυξη και διαφοροποίηση πολλαπλών συστατικών του αγγειακού συστήματος, ειδικά αγγείων του αίματος και λέμφου [67].

4.4.2 Ασθένειες που σχετίζονται με την αγγειογένεση

Σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις, διαταράσσεται η ισορροπία μεταξύ των τοπικών ανασταλτικών και των αγγειογενετικών διεγερτών και η αγγειογένεση είναι μη ελεγχόμενη και ενεργή για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Υπερπαραγωγή ενός αγγειογενετικού παράγοντα ή έλλειψη ενός αντιαγγειογενετικού ενεργοποιεί τη διαδικασία της αγγειογένεσης. Αυτός ο τύπος της μη ελεγχόμενης αγγειογένεσης χαρακτηρίζει μια σειρά ασθενειών του ανθρώπου με πρώτη τον καρκίνο και περίπου άλλες 70 ασθένειες. Παραδείγματος χάρη, στην αρθρίτιδα, νέα τριχοειδή αγγεία του αίματος εισβάλλουν στις αρθρώσεις και καταστρέφουν το χόνδρο. Στο διαβήτη παρατηρείται εισβολή νέων τριχοειδών του αμφιβληστροειδή χιτώνα στον υαλώδη, όπου αιμορραγούν και προκαλούν

τύφλωση. Η οφθαλμική νεοαγγειογένεση είναι η πιο κοινή αιτία τύφλωσης και κυριαρχεί σε περισσότερες από είκοσι ασθένειες του οφθαλμού [66]. Άλλες παθολογικές καταστάσεις όπου εμφανίζεται σχηματισμός νέων αγγείων είναι οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ψωρίαση, χρόνια φλεγμονή, η αθηροσκλήρωση κ.α.

Όσον αφορά την σχέση της αγγειογένεσης με την ανάπτυξη των όγκων αναγνωρίστηκε και επιβεβαιώθηκε χάρη στις έρευνες του Folkman στην αρχή της δεκαετίας του 70, μέχρι τότε επικρατούσε η άποψη ότι οι όγκοι μπορούν κάλλιστα να αναπτυχθούν με την υπάρχουσα αγγείωση. Ο Folkman απέδειξε με τα πειράματά του ότι οι όγκοι οφείλουν να δημιουργήσουν νέα αγγεία προκειμένου να ικανοποιήσουν τις διατροφικές τους ανάγκες, ενώ ταυτόχρονα εκκρίνουν ορισμένους παράγοντες οι οποίοι ευνοούν την ανάπτυξη των αγγείων. Επομένως, η αγγειογένεση απαιτείται για τη συνέχιση της αύξησης των καρκινικών όγκων είτε είναι πρωτοπαθείς, είτε μεταστατικοί. Επίσης έχει αποδειχθεί ότι, η αυξημένη αγγειογένεση συνδέεται με υψηλό μεταστατικό δυναμικό και κακή πρόγνωση σε πολλούς καρκίνους, όπως του προστάτη, της ουροδόχου κύστης, του πνεύμονα, του ενδομητρίου και του παχέος εντέρου. Αντ' αυτού κατά την απουσία νέων αγγείων που τροφοδοτούν με θρεπτικά υλικά και απομακρύνουν τα άχρηστα προϊόντα του μεταβολισμού των κυττάρων, οι κακοήθεις όγκοι δεν αναπτύσσονται περισσότερο από 1 με 2 χιλιοστά σε διάμετρο [68],[69],[70].



Εικόνα 4.3 Αγγειογένεση σε περιβάλλον κακοήθειας

4.5 Αγγειογένεση ως θεραπευτικός στόχος

Η κατανόηση του ρόλου της αγγειογένεσης στην παθοβιολογία των παραπάνω νοσημάτων έχει οδηγήσει στη διερεύνηση συγκεκριμένων τρόπων παρέμβασης, που στοχεύουν είτε στην προαγωγή, είτε, συνηθέστερα, στην αναχαίτιση της αγγειογένεσης. Συνεπώς, η χρησιμοποίηση συγκεκριμένων ενώσεων που μπορεί να διεγείρουν ή να αναστείλουν την δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων ενδέχεται να βοηθήσει στην καταπολέμηση τέτοιου είδους ασθενειών. Οι μοντέρνες κλινικές εφαρμογές που σχετίζονται με την αγγειογένεση μπορεί να διαιρεθούν σε δύο κύριες κατηγορίες: αντι-αγγειογενετικές και προ-αγγειογενετικές θεραπείες. Η δεύτερη υποομάδα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την θεραπεία καρδιοαγγειακών ασθενειών (ισχαιμία), την πρώτη σε συχνότητα αιτία θανάτου στον δυτικό κόσμο, ενώ οι αντι-αγγειογενετικές θεραπείες κατά προτεραιότητα στοχεύουν στη μάχη κατά του καρκίνου.

Μέχρι σήμερα οι αντικαρκινικές θεραπείες βασίζονταν στην απευθείας επίθεση κατά των καρκινικών κυττάρων είτε με τη χειρουργική αφαίρεση είτε/και με την καταστροφή τους μέσω της ακτινοβολίας ή της χημειοθεραπείας. Στις μέρες μας συνεχίζεται μία φιλόδοξη και

σημαντική προσπάθεια για την ανακάλυψη ουσιών που στόχο έχουν την έμμεση καταστροφή των καρκινικών κυττάρων με τη διακοπή της αιμάτωσής τους και κατά συνέπεια, του εφοδιασμού τους σε οξυγόνο και θρεπτικές ουσίες. Υπάρχουν δυο τρόποι στόχευσης των αγγείων, που είναι εξίσου αποτελεσματικοί στην αναστολή της ανάπτυξης ή μετάστασης των όγκων:

- **Καταστροφή προϋπαρχόντων αγγείων**
- **Αναστολή της αγγειογένεσης**

Στην συγκεκριμένη εργασία στοχεύθηκε η αναστολή της αγγειογένεσης, συνεπώς χρειάστηκε και ένα σύστημα μελέτης της.

4.5.1 Σύστημα μελέτης της αγγειογένεσης

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα συγκροτούν τα αγγεία επομένως έχουν κυρίαρχο ρόλο στη διαδικασία της αγγειογένεσης. Όπως προαναφέρθηκε είναι εκείνα που πρέπει να πολλαπλασιαστούν, να διεισδύσουν στο εξωκυτταρικό υλικό, να μεταναστεύσουν, και να διαφοροποιηθούν ώστε να σχηματίσουν ένα νέο αγγείο. Κάθε μία από αυτές τις επιμέρους διεργασίες επηρεάζει την αγγειογένεση, οπότε μπορεί να αποτελέσει ένα σύστημα *in vitro* μελέτης της δράσης ουσιών με πιθανή ανασταλτική ή επαγωγική δράση [67]. Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία εξετάστηκε η επίδραση εκχυλισμάτων από φυτά της ελληνικής χλωρίδας στον πολλαπλασιασμό καλλιεργούμενων ενδοθηλιακών κυττάρων. Αυτή η κυτταρική δοκιμή χρησιμοποιείται πολύ συχνά για την μελέτη της δράσης ουσιών στην αγγειογένεση. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα επωάζονται στη φάση της εκθετικής τους ανάπτυξης μαζί με τις υπό μελέτη ουσίες για ορισμένα χρονικά διαστήματα (συνήθως 24-72 ώρες) και στην συνέχεια καθορίζεται ο αριθμός τους με διάφορους τρόπους.

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε ο συστηματικός έλεγχος επιμέρους κλασμάτων δραστικών εκχυλισμάτων, τα οποία έχουν απομονωθεί από φυτά της ελληνικής χλωρίδας, σε σχέση με την ικανότητά τους να επηρεάζουν την αγγειογένεση. Ο έλεγχος αυτός πραγματοποιήθηκε μέσω της εξέτασης των κλασμάτων ως προς τη δυνατότητά τους να επιδρούν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ενδοθηλιακών κυττάρων τα οποία αποτελούν τις δομικές μονάδες των αγγείων. Ένας επιπλέον στόχος ήταν η διερεύνηση της επίδρασης καθαρών φυτικών ενώσεων στα επίπεδα έκκρισης ενός πολύ σημαντικού προ-αγγειογενετικού παράγοντα του αυξητικού παράγοντα του ενδοθηλίου (VEGF).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ

5 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Αντιδραστήρια, όργανα και αναλώσιμα

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζεται το σύνολο των αντιδραστηρίων, των όργανων και αναλώσιμων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας αυτής της διπλωματικής εργασίας. Επίσης, παραθέτονται οι εταιρείες παραγωγής και οι έδρες τους ανά τον κόσμο.

Πίνακας 5.1 Αντιδραστήρια, εταιρείες παραγωγής και οι έδρες τους

Αντιδραστήρια	Εταιρεία παραγωγής	Έδρα της εταιρείας
Υλικό καλλιέργειας (DMEM 1X) <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	GIBCO	USA
PBS Dulbecco 1X <i>Phosphate Buffer Saline w/o Ca²⁺ & Mg²⁺</i>	BIOCHROM A6	BERLIN
FBS (<i>Fetal bovine serum</i>)	GIBCO	USA
L-γλουταμίνη και αντιβιοτικά (Pen/Str)	BIOCHROM A6	BERLIN
TRYPsin 0,5%-EDTA	GIBCO	USA
Trypan blue	SIGMA	USA/GERMANY
DMSO (<i>dimethyl sulfoxide</i>)	Applichem	GERMANY
Διάλυμα MTT 10X .	SIGMA	USA/GERMANY
Διάλυμα HCL 1N	SIGMA	USA/GERMANY
Διάλυμα HAT (<i>hypoxanthine-aminopterin-thymidine</i>)	GIBCO	USA
BSA (<i>Bovine serum albumin</i>)	SIGMA	USA/GERMANY
Διάλυμα πρωτογενούς αντισώματος (<i>Capture antibody</i>)	R&D DUOSET ELISA KIT	USA/UK/CHINA
Reagent Diluent	R&D DUOSET ELISA KIT	USA/UK/CHINA
Wash buffer (TWEEN 1:200 PBS)	R&D DUOSET ELISA KIT	USA/UK/CHINA
Διάλυμα δευτερογενούς αντισώματος (<i>Detection Antibody</i>)	R&D DUOSET ELISA KIT	USA/UK/CHINA
Διαλύμα στρεπταβιδίνης- HRP	R&D DUOSET ELISA KIT	USA/GERMANY
Πυκνό θειικό οξύ 2N (<i>Stop solution</i>)	SIGMA	

Πίνακας 5.2 Χρησιμοποιούμενα όργανα, εταιρείες παραγωγής και οι έδρες τους

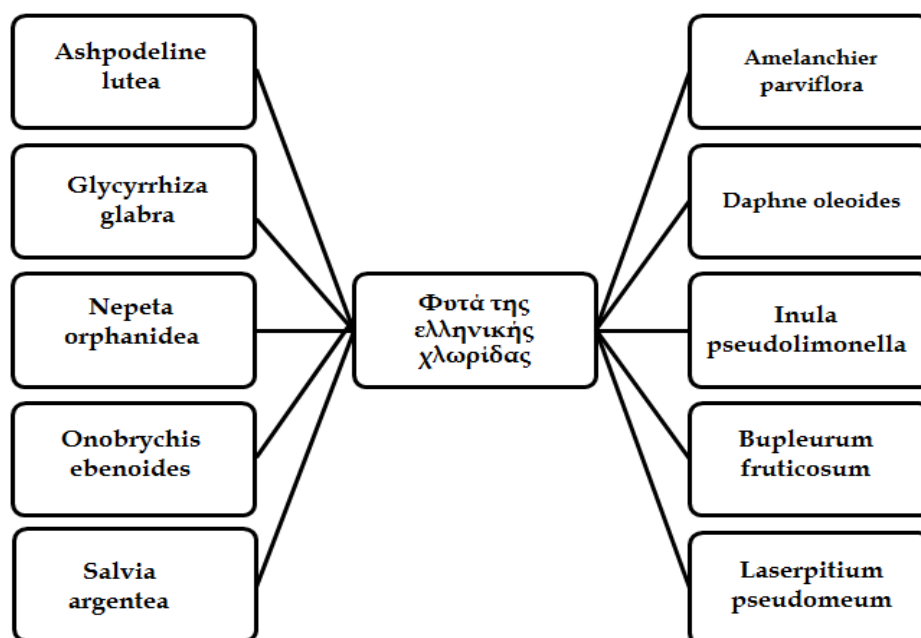
Όργανα	Εταιρεία παραγωγής	Έδρα της εταιρείας
Θάλαμος νηματικής ροής MULTIMATE	Safemate 1.2 (Euroclone s.p.a)	ITALY
Φυγόκεντρος Μεγάλη	Thermo Fisher Scientific	GERMANY
Μικρή	Hettick Zentrifugen	GERMANY
Επωαστήρα 37°C-5%CO ₂	Thermo Scientific	USA
Μικροσκόπιο	Carl Zeiss AG	GERMANY
Υδατόλουτρο	BACACOS Scientific	GREECE
Φωτόμετρο	TECAN	AUSTRIA
Ειδικό δοχείο ψύξης (υγρό άζωτο)	Cryomed Thermo	USA
κυττάρων στους -80°C	Scientific	
Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer	SIGMA	USA/GERMANY
Πιπέτες Pipetgun	GILSON Costar	NETHERLANDS USA

Πίνακας 5.3 Χρησιμοποιούμενα αναλώσιμα, εταιρείες παραγωγής και οι έδρες τους

Αναλώσιμα	Εταιρεία παραγωγής	Έδρα της εταιρείας
Αποστειρωμένα σωληνάρια Falcon 50mL	SARSTEDT	GERMANY
Falcon 10mL	Greiner bio-one	GERMANY
Ειδικά τρυβλία κυτταροκαλλι- έργειας 10-cm	Greiner bio-one	GERMANY
Πιπέτες μιας χρήσης Πιπέτες 5-10 mL	SARSTEDT	GERMANY
Πιπέτες 25 mL	Corning Incorporated	N.Y USA
Επεντορφ	SARSTEDT	GERMANY
Ειδικά φιαλίδια για την ψύξη των κυττάρων (cryovials).	Greiner bio-one	GERMANY
Πλάκες 96 φρεατίων κατάλληλα για κυτταροκαλλιέργειες	Greiner bio-one	GERMANY
Πλάκες Χ φρεατίων κατάλληλες για μέθοδο ELISA	Greiner bio-one	GERMANY
Τιπς Μπλε & λευκά	SARSTEDT	GERMANY
Κίτρινα	Corning Incorporated	N.Y USA

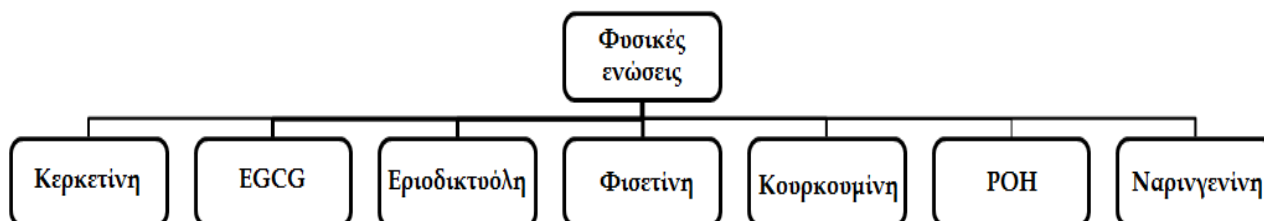
5.2 Κλάσματα εκχυλισμάτων φυτικής προέλευσης και καθαρές φυσικές ενώσεις

Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία εξετάζονται 111 κλάσματα εκχυλισμάτων φυτικής προέλευσης, τα οποία λαμβάνονται έτοιμα από την Φαρμακευτική Σχολή Αθηνών. Τα εκχυλίσματα αυτά προέρχονται από φυτά της ελληνικής χλωρίδας. Για την απομόνωση των κλασμάτων ANGF από τα φυτικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της Χρωματογραφίας Κατανομής με Φυγοκέντρηση (FCPC). Η Χρωματογραφία Κατανομής με Φυγοκέντρηση (Fast Centrifugal partition chromatography, FCPC) είναι μια τεχνική διαχωρισμού, η οποία βασίζεται στην ύπαρξη δύο μη αναμειγνυόμενων υγρών φάσεων, εκ των οποίων η μία παραμένει στατική, ενώ η άλλη αποτελεί την κινητή φάση. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου περιλαμβάνει το διαχωρισμό των συστατικών ενός μίγματος με βάση τους συντελεστές κατανομής τους (K_d) στις δυο υγρές φάσεις. Καθώς η κινητή φάση διέρχεται διαμέσου της στατικής, παρασύρει τα συστατικά του μίγματος με διαφορετική ταχύτητα το καθένα και ανάλογα με το συντελεστή κατανομής τους, κάνοντας έτσι δυνατό το διαχωρισμό και την απομόνωση τους. Παρακάτω παρουσιάζονται τα εν λόγω φυτά:



Σχήμα 5.1 Φυτά της ελληνικής χλωρίδας από τα οποία προέρχονται τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα.

Ενώ, στο δεύτερο σκέλος της διπλωματικής αυτής εργασίας εξετάζονται καθαρές απομονωμένες ενώσεις από φυσικά προϊόντα. Οι φυσικές αυτές ενώσεις είναι οι εξής:



Σχήμα 5.2 Εξεταζόμενες φυσικές ενώσεις

5.2.1 Μεθοδολογία επεξεργασίας κλασμάτων φυτικής προέλευσης

Οι ουσίες αυτές διαλύθηκαν με σταδιακή προσθήκη καθαρού dimethyl sulfoxide (DMSO) και συνεχής ανάμιξη με πιπέττα, vortex mixer ή/και κατεργασία με υπερήχους (SONICATION), όπου αυτό ήταν αναγκαίο. Αρχικά, παρασκευάστηκαν stock solutions των πειραματικών ουσιών σε 100% DMSO τα οποία διατηρήθηκαν στους -20°C. Έπειτα, οι ουσίες αραιώθηκαν περαιτέρω σε θρεπτικό υλικό κυτταροκαλλιέργειας στις κατάλληλες τελικές συγκεντρώσεις. Η τελική περιεκτικότητα σε DMSO ήταν 0,1% κ/ό.

5.3 Κυτταρικές σειρές

Με βασικό στόχο τη μελέτη της επίδρασης φυσικών προϊόντων στην αγγειογένεση, εξετάστηκε η επίδραση των παραπάνω εκχυλισμάτων στον πολλαπλασιασμό ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς τα κύτταρα αυτά έχουν πρωταγωνιστικό ρόλο σε κάθε στάδιο της αγγειογένεσης. Στην συγκεκριμένη εργασία επιλέχθηκαν να καλλιεργηθούν ενδοθηλιακά κύτταρα της κυτταρικής σειράς EAhy 926. Η EAhy 926 προέρχεται από την σύντηξη ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων ομφάλιας φλέβας (HUVECs) με κύτταρα της κυτταρική σειράς A549, προερχόμενα από καρκίνωμα του πνεύμονα, με έκθεση σε polyethylene glycol (PEG). Αυτή είναι προς το παρόν, η καλύτερη αναγνωρισμένη μακροαγγειακή ενδοθηλιακή κυτταρική σειρά που παρουσιάζει λειτουργικά χαρακτηριστικά διαφοροποιημένων ενδοθηλιακών κυττάρων, και επομένως θεωρήθηκε κατάλληλη ως πειραματικό μοντέλο για τον προσδιορισμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού κατόπιν επώασης με τις ουσίες προς εξέταση. Ενώ στο δεύτερο σκέλος αυτής της διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκε η καρκινική σειρά ανθρώπινου ηπατοκαρκινώματος (Hep3B) [71].

Συνθήκες καλλιέργειας

Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται σύμφωνα με το λειτουργικό πρωτόκολλο. Καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) εμπλουτισμένο με 10% ορό βοός (foetal bovine serum, FBS), πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη και υποξανθίνη, αμινοπτερίνη και θυμιδίνη (hyroxanthine, aminopterin, thymidine, HAT). Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε καθιερωμένες ασηπτικές συνθήκες και διατηρήθηκαν στους 37°C, 5% CO₂ [72].

5.4 Κυτταρικές καλλιέργειες

Οι κυτταρικές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν αρχικά ως μια μέθοδος μελέτης της συμπεριφοράς των κυττάρων, ελεύθερων από πιθανές *in vivo* επιδράσεις που συμβαίνουν στον οργανισμό. Σκοπός των κυτταροκαλλιέργειών είναι να διατηρηθούν τα κύτταρα βιώσιμα, μακριά από το φυσιολογικό οργανισμό από τον οποίον προήλθαν και κάτω από ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες. Όλες οι εργασίες γίνονται σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, ο οποίος είναι εξοπλισμένος με υπεριώδης (UV) λάμπα και φίλτρα αέρος ώστε οι συνθήκες εργασίας να είναι άσηπτες. Τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C στον επωαστήρα (incubator) σε κορεσμένες συνθήκες υγρασίας και παρουσία 5% CO₂.

5.5 Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων αποσκοπεί στη ομαλή ανάπτυξη των κυττάρων και διασφαλίζει την ποσότητα των κυττάρων που χρειάζεται για διάφορες πειραματικές διαδικασίες. Τα κύτταρα αφήνονται να πολλαπλασιαστούν μέχρις ότου η ανάπτυξή τους δεν επηρεάζεται από την έλλειψη χώρου, αφού έχει παρατηρηθεί ότι αυτό προκαλεί αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και τροποποίηση του κυτταρικού μεταβολισμού (contact Inhibition). Η ανακαλλιέργεια γίνεται σε τακτά χρονικά διαστήματα όταν η κάλυψη της επιφάνειας του τρυβλίου κυτταροκαλλιέργειας αντιστοιχεί σε 80-90 %.

Διαλύματα

- Υλικό καλλιέργειας (DMEM 1X, *Gibco*) εμπλουτισμένο με 10% ορό νεογέννητου βοός (FBS,*Gibco*), Gln και αντιβιοτικά (Pen/Str, *Biochrom*)
- PBS Dulbecco 1X, *Biochrom* (Phosphate Buffer Saline)
- Τρυψίνη-EDTA, *Gibco*

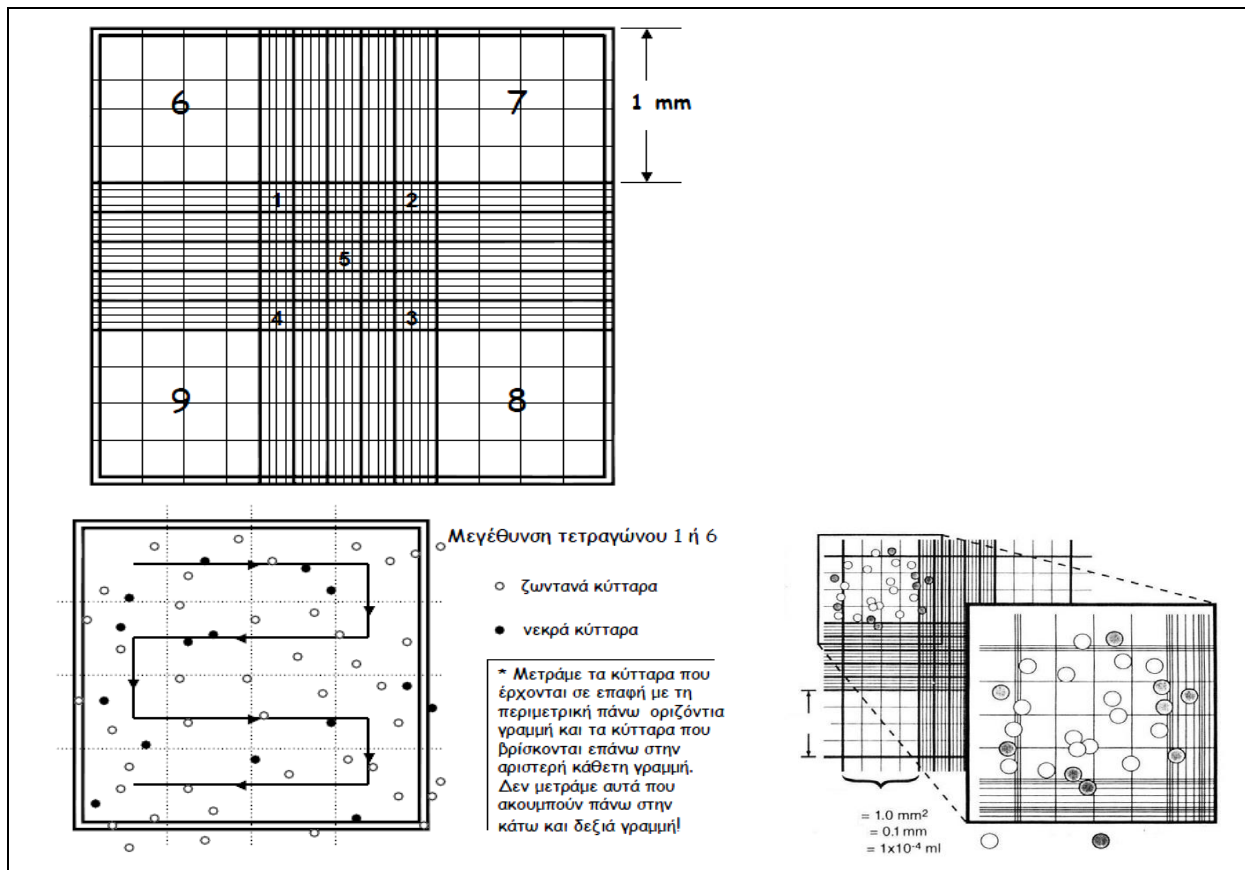
Μεθοδολογία

Όταν στο μικροσκόπιο παρατηρηθεί ότι τα κύτταρα έχουν καλύψει κατά 80 με 90 % την επιφάνεια του τρυβλίου καλλιέργειας, γίνεται ανακαλλιέργεια. Συνοπτικά, το τρυβλίο μεταφέρεται σε θάλαμο νηματικής ροής όπου είναι δυνατή η εργασία υπό στείρες συνθήκες. Γίνεται αναρρόφηση του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας με πιπέτα Pasteur υπό κενό και ξέπλυμα των κυττάρων δύο φορές με PBS ώστε να απομακρυνθούν τυχόν εναπομείναντα ίχνη ορού, τα οποία περιέχουν αναστολές της τρυψίνης καθώς και τυχόν άχρηστα κυτταρικά υπολείμματα. Στην συνέχεια προστίθενται 3 mL DMEM και 1 mL τρυψίνη. Η τρυψίνη διασπά τους δεσμούς των κυττάρων, με αποτέλεσμα να γίνει αποκόλληση τους από το τρυβλίο. Τα κύτταρα δεν ενδείκνυνται να παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα (10 min) εκτεθειμένα σε τρυψίνη γιατί κινδυνεύει η επιβίωση τους. Γι'αυτό το λόγο γίνεται συνεχής παρακολούθηση της πορείας αποκόλλησης των κυττάρων σε μικροσκόπιο: τα κύτταρα που έχουν αποκολληθεί αποκτούν σφαιρική μορφή. Όταν κριθεί σκόπιμο γίνεται αναστολή της δράσης της τρυψίνης με προσθήκη τουλάχιστον διπλάσιου (ως προς τον όγκο της τρυψίνης) όγκου πλήρους θρεπτικού μέσου. Το συγκεκριμένο εναιώρημα μεταφέρεται σε αποστειρωμένο σωλήνα (falcon 15mL) και φυγοκέντρειται στα 280 g για 5 min στους 25 °C. Τέλος, γίνεται απομάκρυνση του υπερκείμενου θρεπτικού μέσου και το κυτταρικό ίζημα επαναωρείται σε συγκεκριμένο όγκο πλήρους θρεπτικού μέσου με την βοήθεια πιπέτας.

5.6 Μέτρηση κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer

Η μέτρηση των κυττάρων με αιματοκυτταρόμετρο είναι η πιο απλή, άμεση και οικονομική μέθοδος υπολογισμού του αριθμού των κυττάρων που βρίσκονται σε εναιώρημα.

Το αιμοκυτταρόμετρο, ή αλλιώς γνωστό και ως Neubauer, είναι μια ειδικά κατασκευασμένη αντικειμενοφόρος που έχει δύο κατάλληλα επεξεργασμένες λείες επιφάνειες με τη δική της καλυπτρίδα. Αρχικά, κατασκευάστηκε για την καταμέτρηση των στερεών συστατικών του αίματος (ερυθρά αιμοσφαίρια, λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια.) σε ορισμένο όγκο αίματος. Το όργανο όμως αυτό, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την καταμέτρηση άλλων μικροσκοπικών δομών ή κυττάρων που βρίσκονται σε εναιώρημα, όπως για παράδειγμα τα κύτταρα μιας κυτταροκαλλιέργειας.



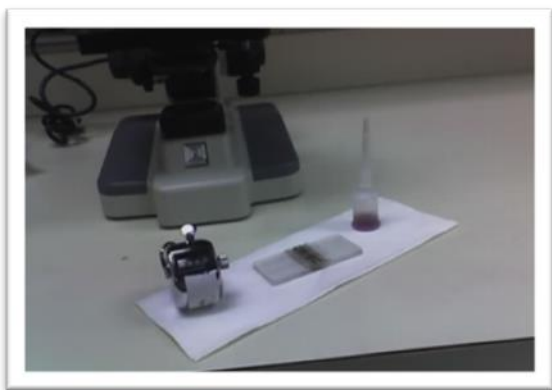
Εικόνα 5.1 Αιμακυτταρόμετρο Neubauer. Παρουσιάζεται σχηματικά ο τρόπος υπολογισμού του αριθμού των κυττάρων.

Κάθε επεξεργασμένη επιφάνεια φέρει ένα τετράγωνο πλέγμα, το οποίο αποτελείται από 9 κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1 mm. Επίσης, κάθε ένα από τα κύρια τετράγωνα έχει επιπλέον διαβαθμίσεις για να διευκολύνεται η μέτρηση των κυττάρων. Το επίπεδο του πλέγματος βρίσκεται 0,1 mm χαμηλότερα από δύο «ράχες» στις οποίες στηρίζεται η καλυπτρίδα. Υπάρχει μια κοίλη επιφάνεια μεταξύ της εξωτερικής πλευράς κάθε τετραγωνισμένης λείας επιφάνειας και των σημείων που στηρίζεται η καλυπτρίδα. Στην κοίλη αυτή επιφάνεια μεταφέρεται το κυτταρικό εναιώρημα, το οποίο με τριχοειδικά φαινόμενα απλώνεται στην τετραγωνισμένη επιφάνεια. Ο όγκος του κυτταρικού εναιωρήματος που θα καλύπτει ένα από τα εννέα τετράγωνα είναι 0,1 mm³ ή 1 x10⁻⁴ ml. Έτσι η συγκέντρωση των κυττάρων στο αρχικό εναιώρημα (σε κύτταρα/ml) είναι:

$$\text{Αριθμός κυττάρων στο ένα από τα κύρια τετράγωνα} \times 10^4 \text{ [73].}$$

Μεθοδολογία

Αρχικά γίνονται προετοιμασίες χρήσης του αιμακυτταρόμετρου, απολυμαίνεται με αιθανόλη και στηρίζεται η καλυπτρίδα πάνω στις δύο ράχες. Έπειτα επαναιωρούνται τα κύτταρα με πιπέτα μέχρις ότου να μην υπάρχουν συσσωματώματα που θα κάνουν δύσκολο τον υπολογισμό του αριθμού των κυττάρων στο αιματοκυτταρόμετρο και αφαιρούνται 90 μL τα οποία τοποθετούνται σε ένα επεντορφ στο οποίο προστίθεται 10 μL Trypan blue.



Εικόνα 5.2 Αιμακυτταρόμετρο, μετρητής(αριστερά) και Trypan blue (δεξιά)

Αυτό είναι μία ζωτική χρωστική που χρησιμοποιείται για την πιο εύκολη ανίχνευση των ζωντανών κυττάρων από τα νεκρά αφού αυτά τα τελευταία χρωματίζονται με μπλε χρώμα παρουσία του Trypan blue. Έπειτα, 10 μL από το εναιώρημα των κυττάρων προστίθεται στην ειδική υποδοχή του αιματοκυτταρόμετρου. Τέλος παρατηρούνται με μικροσκόπιο και μετρούνται τα κύτταρα που βρίσκονται στα 4 εξωτερικά τετράγωνα, που το καθένα έχει 16 πιο μικρά τετραγώνια. Παίρνονται υπόψη τα κύτταρα που είναι μέσα

και αυτά που μπορεί να βρίσκονται στις εξωτερικές πλευρές αυτών των τετραγώνων, με την προϋπόθεση ότι η μεγαλύτερη επιφάνεια τους βρίσκεται προς την μέσα πλευρά. Τέλος υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων που βρίσκεται στο συνολικό διάλυμα .

5.6.1 Παράδειγμα υπολογισμού αριθμού κυττάρων

Υποθέτεται ότι μετρήθηκαν 23 ,25, 30 ,34 κύτταρα στο κάθε εξωτερικό τετράγωνο τότε κατά μέσο όρο υπολογίζονται :

$$\frac{23 + 25 + 40 + 34}{4} = 28 \cdot 10^{-4} \frac{\text{cells}}{\text{mL}}$$

Αν για παράδειγμα η επιθυμητή συγκέντρωση των κυττάρων που απαιτείται για ένα πείραμα είναι 4000 cells/mL σε συνολικό όγκο 12 mL, υπολογίζεται μέσο του νόμο των αραιώσεων :

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

ο όγκος V_1 του αρχικού κυτταρικού διαλύματος γνωστής συγκέντρωσης που θα χρειαστεί:

$$V_1 = \frac{C_2 \cdot V_2}{C_1} = \frac{4000 \frac{\text{cells}}{\text{mL}} \cdot 12\text{mL}}{28 \cdot 10^{-4} \frac{\text{cells}}{\text{mL}}} = 0,171\text{mL}$$

Επομένως θα χρησιμοποιηθεί 0,171 mL από το αρχικό κυτταρικό διάλυμα και θα προσθούν 11, 82 mL καλλιεργητικού μέσου, ώστε τελικά να προκύψει τελικό διάλυμα με συγκέντρωση $4000 \frac{\text{cells}}{\text{mL}}$

5.7 Κατάψυξη κυττάρων

Η δυσκολία εύρεσης κυτταρικών σειρών αλλά και το κόστος τους, έχει οδηγήσει στην ανάγκη κατάψυξης των κυττάρων και μακρά αποθήκευσή τους σε περιβάλλον υγρού αζώτου σε θερμοκρασίες μεταξύ -135°C και -175°C . Προϋπόθεση για να πραγματοποιηθεί επιτυχώς η

διαδικασία αυτή είναι η καλή μεταβολική κατάσταση των κυττάρων πριν από την ψύξη τους. Για το λόγο αυτό προτιμάται η ψύξη των κυττάρων να πραγματοποιείται όταν τα κύτταρα έχουν καλύψει 80-90% της επιφάνειας του τρυβλίου.

Διαλύματα

- Διάλυμα DMSO, *Applichem*
- Πλήρες καλλιεργητικό μέσο DMEM, *Gibco*.

Μεθοδολογία

Αρχικά γίνεται αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια του τρυβλίου 10-cm, τα οποία καλλιεργούνται, όπως περιγράφηκε παραπάνω, συλλέγεται το υπερκείμενο σε ένα σωληνάριο των 15 mL και φυγοκεντρείται για 5 min στα 280 g. Συγχρόνως, παρασκευάζεται ένα διάλυμα με πλήρες θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% κ/ο Dimethyl Sulfoxide (DMSO). Η ουσία αυτή χρησιμοποιείται για να προστατεύει τα κύτταρα από τη δημιουργία κρυστάλλων νερού στο εσωτερικό τους κατά την ψύξη. Όταν ολοκληρωθεί η φυγοκέντρηση, αφαιρείται το υπερκείμενο και γίνεται επαναιώρηση του ιζήματος των κυττάρων σε 1 mL θρεπτικού μέσου-DMSO. Το κυτταρικό διάλυμα μεταφέρεται σε cryovial στο οποίο έχουν καταγραφεί όλες οι αναγκαίες πληροφορίες όπως κυτταρικός τύπος, η ημερομηνία ψύξης κλπ. Έπειτα το cryovial, για να επιτευχθεί μια σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας των κυττάρων (περίπου 10 °C ανά ώρα), άρα μεγαλύτερη βιωσιμότητα των κυττάρων, τοποθετείται σε κατάλληλο δοχείο ψύξης για 12-36 ώρες στους -20°C. Τέλος, τα κύτταρα μεταφέρονται σε δοχείο με υγρό άζωτο στους -80°C όπου και μπορούν να διατηρηθούν για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα.

5.8 Απόψυξη κυττάρων

Η διαδικασία γίνεται υπό άσηπτες συνθήκες και όσο το δυνατόν ταχύτερα, προκειμένου τα ξεπαγωμένα κύτταρα να μην εκτεθούν για πολύ στο DMSO, το οποίο δρα τοξικά

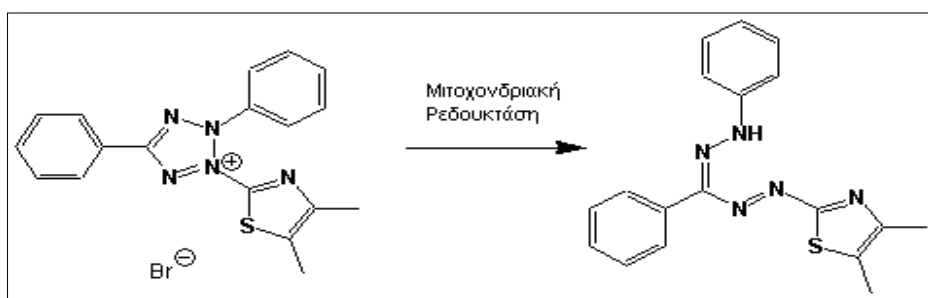
Μεθοδολογία

Αρχικά το φιαλίδιο των παγωμένων κυττάρων τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 37°C για ένα σύντομο χρονικό διάστημα μέχρι ότου να λιώσουν οι κρύσταλλοι. Έπειτα όλο το περιεχόμενο του φιαλιδίου μεταφέρεται σε αποστειρωμένο σωληνάριο των 15 ml που περιέχει 9 mL πλήρους θρεπτικού μέσου, με σκοπό την άμεση αραιώση της συγκέντρωσης του DMSO. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 280 g για 5 min στους 25°C. Στην συνέχεια αφαιρείται το υπερκείμενο και γίνεται επαναιώρηση του ιζήματος των κυττάρων σε 4 mL πλήρους θρεπτικού μέσου. Το κυτταρικό διάλυμα προστίθεται σε ένα τρυβλίο 10 cm που περιέχει 6 mL πλήρους θρεπτικού μέσου και τοποθετείται σε επωαστήρα 37°C-5% CO₂.

5.9 Προσδιορισμός κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη μέθοδο MTT (MTT assay)

Η μέθοδος MTT είναι μια μέθοδος μέτρησης της βιωσιμότητας των κυττάρων και χρησιμοποιείται είτε για έλεγχο του πολλαπλασιασμού είτε για δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας. Αυτή περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Mosmann το 1983 και βασίζεται στην μετατροπή των αλάτων τετραζολίου σε μη διαλυτά παράγωγα φορμαζάνης. Το MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma) είναι

ένα υδατοδιαλυτό άλας τετραζόλης κίτρινου χρώματος που οξειδώνεται από τις αφυδρογονάσες των μιτοχονδρίων των ζωντανών κυττάρων και δίνει αδιάλυτους πορφυρού χρώματος κρυστάλλους φορμαζάνης, οι οποίοι συσσωρεύονται στα μιτοχόνδρια του κυττάρου. Η οξείδωση του MTT πραγματοποιείται μόνο όταν τα μιτοχονδριακά ένζυμα είναι μεταβολικώς ενεργά και συνεπώς η παραγωγή κρυστάλλων φορμαζάνης είναι απευθείας ανάλογη του αριθμού βιώσιμων κυττάρων. Το προϊόν της αντίδρασης διαλυτοποιείται με την προσθήκη διαλύματος HCL και το χρώμα που παράγεται υπολογίζεται φασματοφωτομετρικά στα 595 και 630nm [74].



Σχήμα 5.3 Αντίδραση αναγωγής του κίτρινου άλατος τετραζολίου (MTT) σε πορφυρού χρώματος κρυστάλλους φορμαζάνη από το ένζυμο ρεδουκτάση

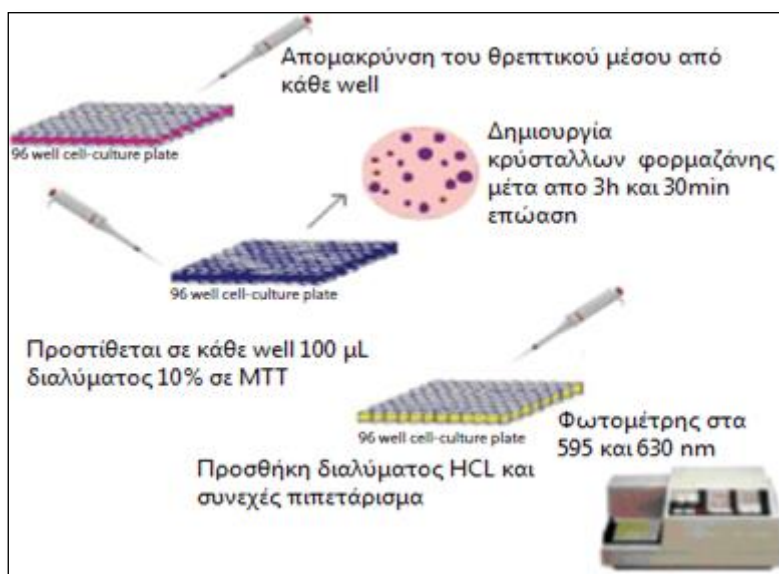
Υλικά και Διαλύματα

- Υλικό καλλιέργειας (DMEM 1X, *Gibco*) εμπλουτισμένο με 10% ορό νεογέννητου βούδ (FBS, *Gibco*), Gln και αντιβιοτικά (Pen/Str, *Biochrom*)
- PBS Dulbecco 1X, *Biochrom*
- Διάλυμα MTT 10X, *Sigma*. (Διατηρείται στους 4°C απουσία φωτός).
- Διάλυμα HCL 1N, *Sigma*

Μεθοδολογία

Αρχικά τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται σε πλάκα 96 φρεατίων όπου τοποθετούνται 4000 κύτταρα ανά φρεάτιο σε 100 μ L πλήρους θρεπτικού μέσου. Μετά από 24 ώρες επώασης, τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS και επώάζονται σε 75 μ L υλικού καλλιέργειας που δεν περιέχει FBS για 4 ώρες (πρωτόκολλο τροφικής ενδείας ή starvation περιγράφεται στη συνέχεια). Σε αυτό το χρονικό διάστημα παρασκευάζονται 2x διαλύματα από τα εξεταζόμενα κλάσματα φυτικών ενώσεων συγκεκριμένων εκχυλισμάτων (40 μ g/ mL) σε καλλιεργητικό μέσο starvation με 5% κ/ό FBS παρουσία 0.2% κ/ό DMSO. Μετά την ολοκλήρωση της τετράωρης επώασης προσθέτουμε σε κάθε φρεάτιο επιπλέον 75 μ L του διαλύματος των φυτικών κλασμάτων ώστε να επιτύχουμε τελικές συγκεντρώσεις 20 μ g/ mL για κάθε φυτικό κλάσμα σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2,5% κ/ό FBS και 0,1% κ/ό DMSO (το επιτρεπτό όριο του διαλύτη ώστε να μην προκαλέσει τοξικότητα). Οι πλάκες επανατοποθετούνται στον επωαστήρα για 48 ώρες. Κατά την διάρκεια της επώασης τα κύτταρα παρατηρούνται στο μικροσκόπιο ώστε να καταγραφούν τυχόν διακριτές επιδράσεις που μπορεί να έχουν προκαλέσει οι φυτικές ενώσεις στη μορφολογία και τον αριθμό των κυττάρων. Αυτό γίνεται ώστε να συνδυαστούν οι μικροσκοπικές παρατηρήσεις με τα αποτελέσματα από τη δοκιμασία MTT. Μετά από 48 ώρες οι πλάκες τοποθετούνται στον θάλαμο νηματικής ροής, όπου και απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο και προστίθενται σε κάθε φρεάτιο 100 μ L

διαλύματος 10% κ/ό MTT, το οποίο έχει παρασκευαστεί ακριβώς πριν τη χρήση σε ασηπτικές συνθήκες και απουσία φωτός. Το διάλυμα MTT τοποθετείται επίσης και σε 3-5 φρεάτια χωρίς κύτταρα που θα αποτελέσουν τον αρνητικό μάρτυρα. Η επώαση των κυττάρων με το MTT συνεχίζεται για άλλες 3,5 ώρες οπότε προστίθεται σε κάθε φρεάτιο 100 μ L διαλύματος συγκέντρωση 1N HCL. Ακολουθεί πιπετάρισμα ώστε να διαλυθούν όλοι οι κρύσταλλοι φορμαζάνης και τέλος γίνεται φωτομέτρηση στα 595 και 630 nm σε φωτόμετρο tescan. Από τις απορροφήσεις υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων με βάση πρότυπη καμπύλη που έχει ήδη κατασκευαστεί

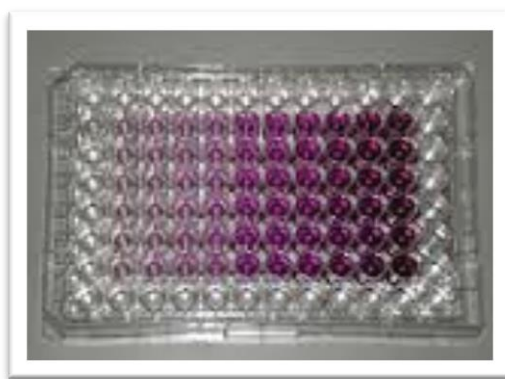


Σχήμα 5.4 Σχηματική παράσταση της μεθόδου MTT

5.9.1 Δημιουργία πρότυπης καμπύλης

Για την δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης είναι απαραίτητα ζεύγη τιμών οπτικής πυκνότητας πρότυπων δειγμάτων με γνωστό αριθμό κυττάρων και ο αριθμός αυτός. Επομένως, αφού έχει πραγματοποιηθεί η ανακαλλιέργεια των κυττάρων και η μέτρηση τους σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer, παρασκευάζονται τα κυτταρικά διαλύματα επιθυμητής συγκέντρωσης. Οι αραιώσεις υπολογίζονται κατάλληλα έτσι ώστε σε κάθε φρεάτιο της πλάκας 96 φρεατίων να προστεθούν 100 μ L κυτταρικού διαλύματος που να περιέχουν από 2000 έως 20.000 κύτταρα. Ακολουθεί επώαση για 16 ώρες οπότε αφαιρείται το καλλιεργητικό μέσο, προστίθεται διάλυμα MTT και ακολουθεί η πρωαναφερθέντα μεθοδολογία. Τέλος, μετά από την φωτομέτρηση και την καταγραφή των OD, αναλύονται τα αποτελέσματα, δημιουργείται η πρότυπη καμπύλη και υπολογίζεται η εξίσωση που συνδέει την οπτική πυκνότητα με τον αριθμό κυττάρων.

Παρακάτω παρουσιάζεται μια ενδεικτική εικόνα μιας πλάκας 96 φρεατίων πριν την φωτομέτρηση. Παρατηρείται ότι υπάρχει μια αύξουσα τάση στην ένταση του μωβ χρώματος που είναι ανάλογη με την παραγωγή κρυσταλλών φορμαζάνης και συνεπώς είναι απευθείας ανάλογη του αριθμού ζωντανών μεταβολικά ενεργών κυττάρων.



Εικόνα 5.3 Πλάκα 96 φρεατίων πριν την φωτομέρηση

Σημείωση: Κάθε φορά που χρησιμοποιείται MTT από καινούργια παραλαβή του αντιδραστηρίου επαναλαμβάνεται η παραπάνω διαδικασία και δημιουργείται καινούργια πρότυπη καμπύλη.

5.10 Starvation

Διαλύματα

- Υλικό καλλιέργειας (DMEM 1X, *Gibco*) εμπλουτισμένο με 10% ορό νεογέννητου βοός (FBS,*Gibco*), Gln και αντιβιοτικά (Pen/Str, *Biochrom*)
- PBS Dulbecco 1X με Ca^{2+} και Mg^{2+} , *Biochrom* (Phosphate Buffer Saline)
- BSA, *Sigma*

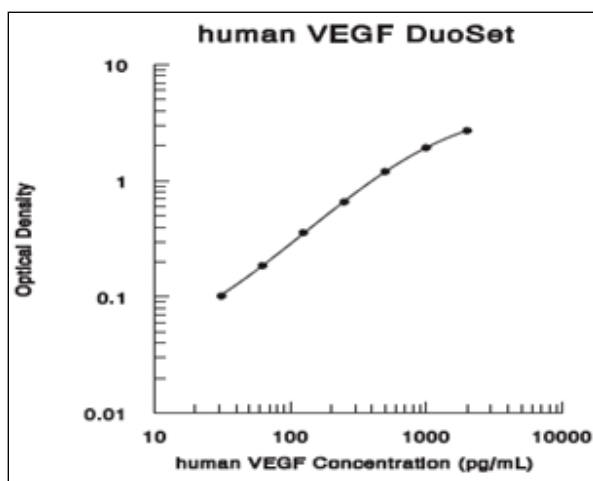
Μεθοδολογία

Η πλάκα 96 φρεατίων τοποθετείται στο θάλαμο νηματικής ροής. Σε κάθε φρεάτιο της πλάκας προστίθεται 100 μL PBS Ca^{2+} και Mg^{2+} , με την βοήθεια πιπέτας απομακρύνεται το μεγαλύτερο ποσοστό του αιωρήματος, αλλά με την προϋπόθεση ότι η επιφάνεια των κυττάρων παραμένει σκεπασμένη. Γίνεται ξέπλυμα των κυττάρων προσθέτοντας 200 μL PBS με Ca^{2+} και Mg^{2+} . Επιλέγεται PBS με ασβέστιο και μαγνήσιο, αφού η παρουσία τους βοηθάει στο να μείνουν προσκολλημένα τα κύτταρα στον πυθμένα των φρεατίων, επομένως αποφεύγεται η απώλεια κυττάρων κατά το ξέπλυμα και συνεπώς τα λανθασμένα αποτελέσματα. Στην συνέχεια προστίθεται 75 μL ελλίπες καλλιεργητικού μέσου 0,25% κ/ο BSA σε κάθε φρεάτιο. Το ελλίπες καλλιεργητικό μέσο δηλαδή χωρίς FBS, αλλά με 0,25% κ/ο BSA έχει παρασκευαστεί από πριν. Τέλος, η πλάκα 96 φρεατίων τοποθετείται στον επωαστήρα για 4 ώρες.

5.11 Η μέθοδος ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Η ELISA είναι μια εργαστηριακή τεχνική που βασίζεται στην ειδική δέσμευση αντιγόνου και αντισώματος προκειμένου να ανιχνευτεί η παρουσία ενός παράγοντα (αντιγόνου ή αντισώματος) σε ένα δείγμα. Αρχή της μεθόδου είναι ότι το αντιγόνο με το αντίσωμα συνδέονται με τρόπο ειδικό και αμφίδρομο, και σχηματίζουν ένα σύμπλοκο το οποίο μπορεί να διαχωριστεί από τα υπόλοιπα ελεύθερα μόρια που περιέχονται στο εξεταζόμενο δείγμα. Η τεχνική της ELISA μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για ποιοτική όσο και για ποσοτική ανάλυση. Η ποιοτική ανάλυση παρέχει απλά ενδείξεις για την ύπαρξη θετικού ή αρνητικού

αποτελέσματος σε ένα δείγμα. Η ποσοτική ανάλυση στηρίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης ή οπτικής πυκνότητας (OD) του δείγματος και στη σύγκριση αυτής με μία πρότυπη καμπύλη προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του αντιγόνου ή του αντισώματος στο δείγμα [75],[76].



Εικόνα 5.4 Παράδειγμα πρότυπης καμπύλης για τον ποσοτικό προσδιορισμό του δείγματος. Στον άξονα y αναπαρίστανται οι απορροφήσεις πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης και στον άξονα x η συγκέντρωσή τους. Ενώνοντας τα σημεία προκύπτει η πρότυπη καμπύλη. Από την τιμή απορρόφησης του εκάστοτε δείγματος που λαμβάνεται στο τέλος της ELISA, μέσω της πρότυπης καμπύλης, υπολογίζεται η συγκέντρωση π.χ. του παράγοντα VEGF.

Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε μη ανταγωνιστική μέθοδος ELISA (sandwich) για τον προσδιορισμό του αυξητικού παράγοντα του ενδοθηλίου (VEGF). Το VEGF είναι μια κυτταροκίνη με πρωταγωνιστικό ρόλο στην διαδικασία της αγγειογένεσης και θεωρείται ένας κρίσιμος ρυθμιστής της αγγειακής ανάπτυξης. Επομένως, η παρουσία μεγάλης συγκέντρωσης VEGF σε κάποια εξεταζόμενο δείγμα υποδηλώνει τη μεγάλη αύξηση της αγγειακής ανάπτυξης, συνεπώς στο δείγμα αυτό υπάρχει κάποια ουσία με επαγωγική δράση στην αγγειογένεση [67]. Αντ' αυτού, αν προκύψει μια μικρή συγκέντρωση υποδεικνύει την ύπαρξη κάποιας ένωσης με ανασταλτική δράση στην αγγειογένεση.

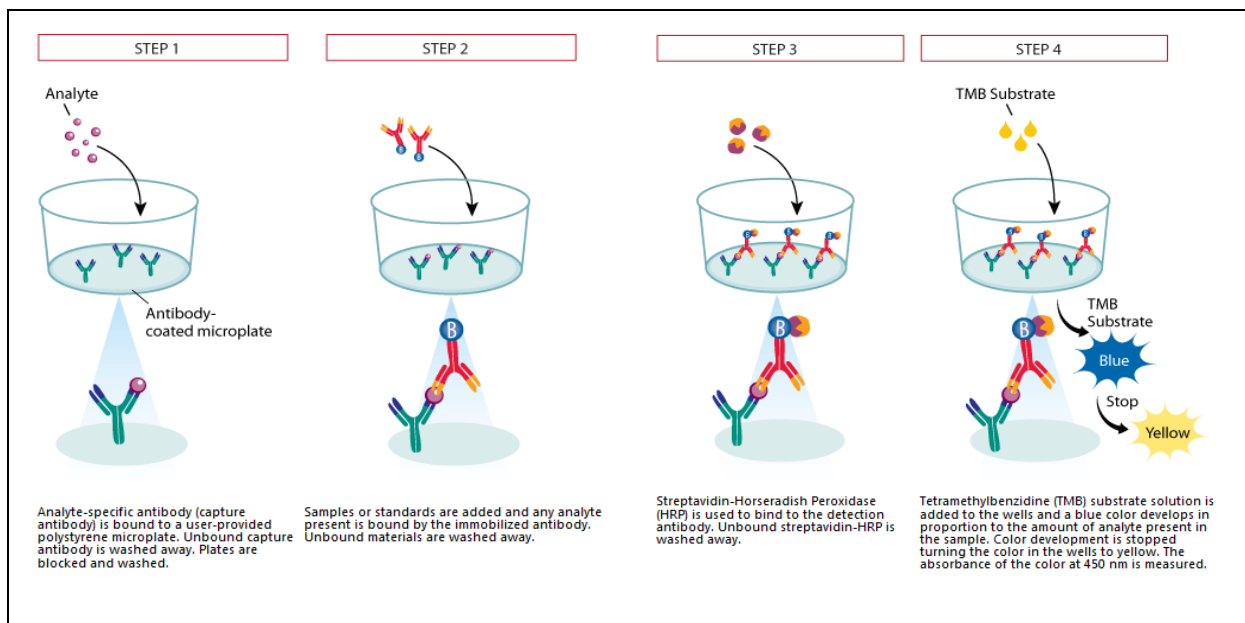
Διαλύματα

- Διάλυμα πρωτογενούς αντισώματος (Capture antibody), *R+D DuoSet ELISA Kit*
- Reagent Diluent, *R+D DuoSet ELISA Kit*
- Wash buffer (TWEEN 1:200 PBS), *R+D DuoSet ELISA Kit*
- Διάλυμα δευτερογενούς αντισώματος (Detection Antibody, *R+D DuoSet ELISA Kit*)
- Διάλυμα στρεπταβιδίνης- HRP, *R+D DuoSet ELISA Kit*
- Πυκνό θειικό οξύ 2N (Stop solution), *Sigma*
- Δείγματα υποεξέταση και πρότυπα δείγματα γνωστής συγκέντρωσης

Μεθοδολογία

Το πρώτο βήμα της μεθόδου ELISA είναι η επιστροφή πρωτογενούς αντισώματος γνωστό ως Capture antibody σε πλάκα ELISA 96 φρεατίων και επώαση της όλη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου. Προϋποθέεται παρασκευή του διαλύματος του πρωτογενούς αντισώματος αραιώσεως 1:180 κ/ό σε PBS. Την επόμενη μέρα αφαιρείται το προαναφερθέν διάλυμα και

ξεπλένεται η πλάκα τρεις φορές με το Wash buffer (TWEEN 1:200 κ/ό PBS) με προϋπόθεση στην τελευταία πλύση να απομακρυνθεί όλο το υγρό. Έπειτα προστίθεται σε κάθε φρεάτιο 300 μL Reagent Diluent και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα. Στην συνέχεια επαναλαμβάνεται η διαδικασία πλύσης 3 φορές και τοποθετούνται στα φρεάτια τα υποεξέταση δείγματα (100 μL / φρεάτιο). Επισημαίνεται σε αυτό το στάδιο, ότι στα 8 πρώτα φρεάτια της πρώτης στήλης τοποθετούνται δείγματα γνωστής συγκέντρωσης. Αποτελέσματα των μετρήσεων τους θα χρησιμοποιηθούν για την δημιουργία της πρότυπης καμπύλης. Η πλάκα επωάζεται για δυο ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα αφαιρείται το υπερκείμενο, ξεπλένεται ξανά η πλάκα τρεις φορές και προστίθενται 100 μL διάλυμα δευτερογενούς αντισώματος γνωστό ως detection Antibody, σε κάθε μικροκυψελίδα. Και σε αυτό το βήμα ακολουθεί επώαση 2 ωρών της πλάκας. Μετά της δυο ώρες αφαιρείται το υπερκείμενο και η πλάκα ξεπλένεται όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως. Έπειτα προστίθενται 100 μL διαλύματος στρεπταβιδίνης- HRP σε κάθε φρεάτιο και γίνεται επώαση της πλάκας για 20 λεπτά αλλά με την προϋπόθεση να είναι σκεπασμένη για να μην είναι διαπερατή από το φως. Μετά από 20 λεπτά και αφού παρατηρείται ότι το υπερκείμενο έχει πάρει ένα μπλε χρώμα προστίθεται 50 μL πυκνό θειικό οξύ 2N γνωστό ως Stop solution . Σε αυτό το στάδιο γίνεται μεταβολή του χρώματος από μπλε σε κίτρινο. Τέλος, μετράται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 450nm. Τα ακολουθούμενα στάδια απεικονίζονται στην Εικόνα 5.5.



Εικόνα 5.5 Παρουσιάζονται αναλυτικά τα στάδια της μη ανταγωνιστικής μεθόδου ELISA (sandwich)

5.12 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του Mann-Whitney test μέσω του προγράμματος Graph pad . Οι συγκρίσεις (μέση τιμή \pm τυπικό σφάλμα από τη μέση τιμή (SEM) έγιναν μεταξύ της κάθε πειραματικής ομάδας και του αντιστοιχου αρνητικού μάρτυρα.

6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

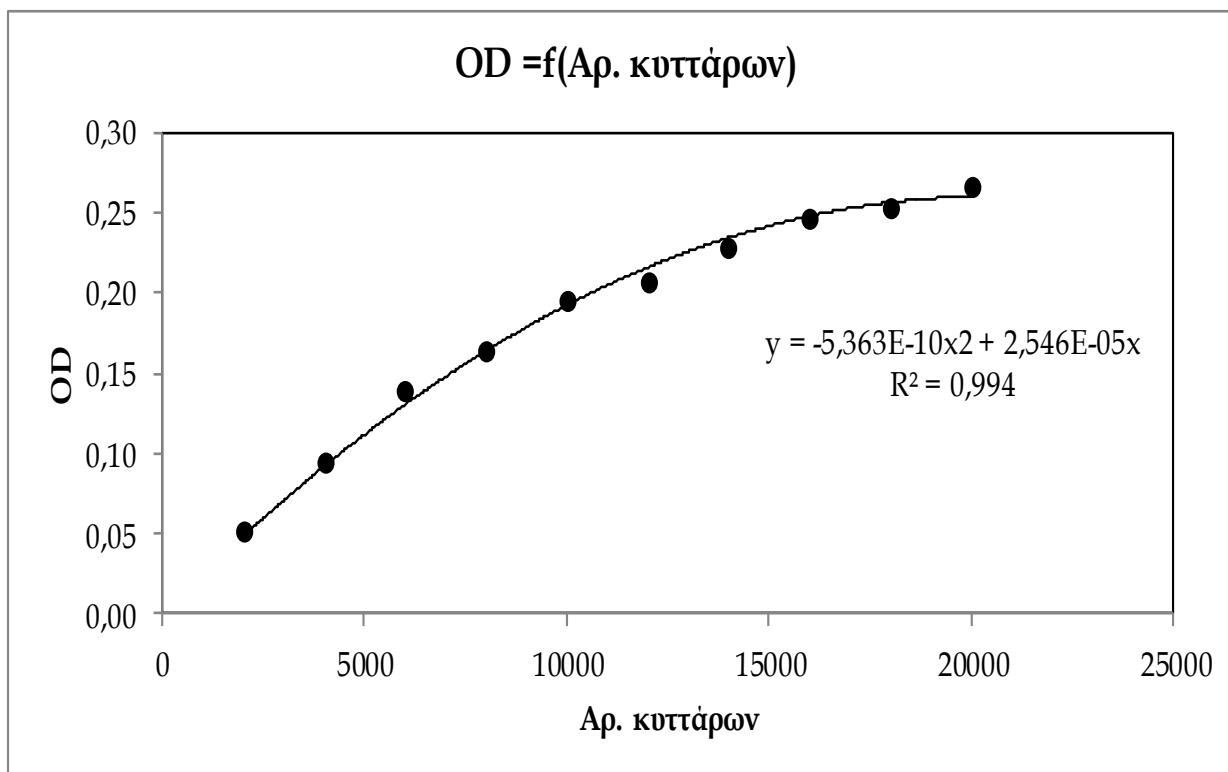
6.1 Μελέτη της επίδρασης φωτικών κλασμάτων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων Παρουσίαση και συζήτηση αποτελεσμάτων της μεθόδου MTT

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης που έγινε με τη μέθοδο MTT στις καλλιέργειες που εκτέθηκαν στα υπό εξέταση κλάσματα εκχυλισμάτων, αλλά και στα αντίστοιχα εκχυλίσματα φυτών της ελληνικής χλωρίδας, εκφράστηκαν ως επί τοις εκατο ποσοστο (%) του αριθμού κυττάρων του αρνητικού μάρτυρα, δηλαδή της ομάδας των κυττάρων που επώαστηκαν με 0,1% DMSO. Επομένως, έπρεπε αρχικά τα εν λόγω αποτελέσματα, δηλαδή οι τιμές απορρόφησης που έχουν καταγράφει σε κάθε εξεταζόμενο δείγμα να μετατραπούν στον αντίστοιχο αριθμό κυττάρων και έπειτα να εκφραστούν ως επί τοις εκατο ποσοστο (%) του αριθμού κυττάρων του αρνητικού μάρτυρα. Η μετατροπή έγινε με την βοήθεια μιας πρότυπης καμπύλη αναφοράς.

Στην υποενότητα § Υλικά και Μέθοδοι αναφέρθηκε ότι για την κατασκευή αυτής της καμπύλης είναι απαραίτητα ζεύγη τιμών οπτικής πυκνότητας πρότυπων δειγμάτων με γνωστό αριθμό κυττάρων και ο αριθμός αυτός (0-20.000 κύτταρα ανά φρεάτιο). Οι τιμές οπτικής πυκνότητας OD καταγράφηκαν μετά από φωτομέτρηση της πλάκας 96 φρεατίων, στα 595nm και πραγματοποιήθηκε διόρθωση στα 630 nm. Παρακάτω παρουσιάζεται σε πινακοποιημένη μορφή ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα ζευγών αριθμών κυττάρων και των αντίστοιχων τιμών OD, όπως και μία από τις κατασκευαζόμενες πρότυπες καμπύλες που χρειάστηκε κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων αυτής της διπλωματικής εργασίας.

Πίνακας 6.1 Ζεύγη τιμών οπτικής πυκνότητας πρότυπων δειγμάτων με γνωστό αριθμό κυττάρων και ο αριθμός αυτός (0-20.000 κύτταρα ανά φρεάτιο)

Αριθμός κυττάρων	Οπτική πυκνότητα (OD)
2000	0,0516
4000	0,0955
6000	0,1395
8000	0,1641
10000	0,1953
12000	0,2076
14000	0,2290
16000	0,2465
20000	0,2533

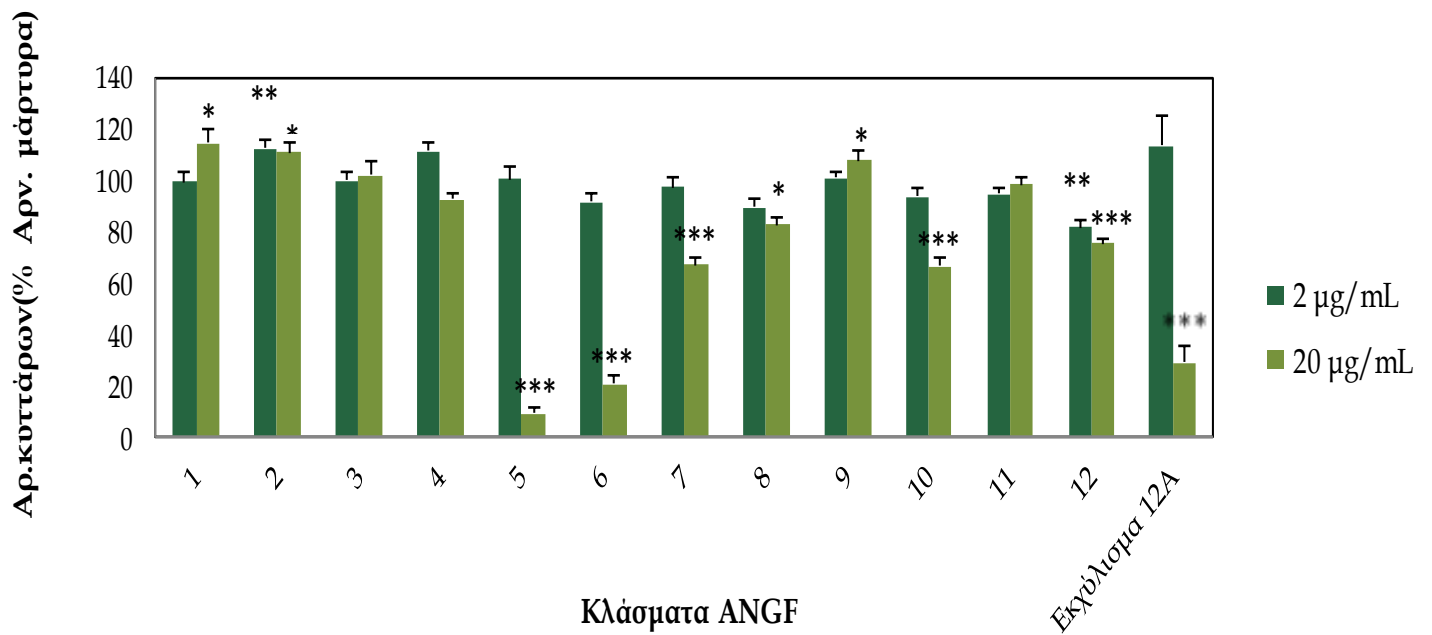


Διάγραμμα 6.1 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς

Στους παρακάτω πίνακες παρατίθενται αριθμητικά οι επιδράσεις των κλασμάτων φυτικών εκχυλισμάτων, ως ποσοστό του κυτταρικού αριθμού συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αυτά έχουν κατηγοριοποιηθεί σε πίνακες με βάση τα εκχυλίσματα από τα οποία προέρχεται το κάθε κλάσμα. Επίσης, παρουσιάζονται τα αντίστοιχα ραβδογράμματα με τετμημένα τα κλάσματα των εκχυλισμάτων και τεταγμένα το επί τοις % του αριθμού κυττάρων του αρνητικού μάρτυρα. Επιπλέον, στους παρακάτω πίνακες παρατηρείται ότι για συγκεκριμένα κλάσματα έχει πραγματοποιηθεί έλεγχος της ικανότητάς τους να επηρεάζουν την αγγειογένεση, όχι μόνο στις δυο συγκεντρώσεις 2μg/mL και 20μg/mL αλλά και σε μια ενδιάμεση συγκέντρωση 10μg/mL. Συγκεκριμένα, αυτό έγινε κυρίως στα κλάσματα τα οποία δεν επηρεάζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στη χαμηλή συγκέντρωση (2μg/mL), αλλά προκαλούν τοξικές επιδράσεις στην υψηλή (20μg/mL). Τα κλάσματα αυτά είναι τα εξής : 51, 60,61,62,72,73,74,76,78,103 . Ο έλεγχος αυτός πραγματοποιήθηκε για να εξετασθεί αν σε μία ενδιάμεση συγκέντρωση των παραπάνω κλασμάτων επιτυγχάνουν και πάλι μια κυτταροτοξική δράση ή μήπως εμφανίζουν μια ανασταλτική δράση στο EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα, που είναι και το ζητούμενο, και επομένως, ενδέχεται να παρουσιάσει και μια αντι-αγγειογενετική δράση σε αυτή την συγκέντρωση.

Πίνακας 6.2 Επίδραση των κλασμάτων ANGF (1-12) και του εκχυλίσματος 12A από το οποίο προέρχονται στον αριθμό των ενδοθηλιακών κυττάρων συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα

ANGF Κλάσματα	Συγκέντρωση (μg/mL)	Αρ. Κυττάρων (% Αρν. μάρτυρα)	% SEM	Mann-Whitney t-test	ANGF εκχυλίσματα Αρ. κυττάρων (% Αρν. μάρτυρα ±SEM)
ANGFfr 1	2	99,174	3,426	ns	12A 113,27 ± 11,85 (2μg/mL) 91,97± 4,6 (10 μg/mL) 28,77 ± 6 (20μg/mL)- τοξικό
	20	114,218	5,215	*	
ANGFfr 2	2	111,992	3,074	**	
	20	110,372	3,751	*	
ANGFfr 3	2	99,833	2,694	ns	
	20	101,612	5,529	ns	
ANGFfr 4	2	110,872	4,111	ns	
	20	92,316	2,452	ns	
ANGFfr 5	2	100,153	4,850	ns	
	20	8,805	2,705	***	
ANGFfr 6	2	91,178	3,612	ns	
	20	20,504	3,019	***	
ANGFfr 7	2	97,183	3,792	ns	
	20	66,572	2,939	***	
ANGFfr 8	2	89,331	3,397	ns	
	20	82,587	2,944	*	
ANGFfr 9	2	100,824	2,346	ns	
	20	107,619	3,752	*	
ANGFfr 10	2	93,330	3,385	ns	
	20	66,052	3,613	***	
ANGFfr 11	2	94,174	3,009	ns	
	20	97,875	2,841	ns	
ANGFfr 12	2	81,379	3,317	**	
	20	74,954	1,843	***	

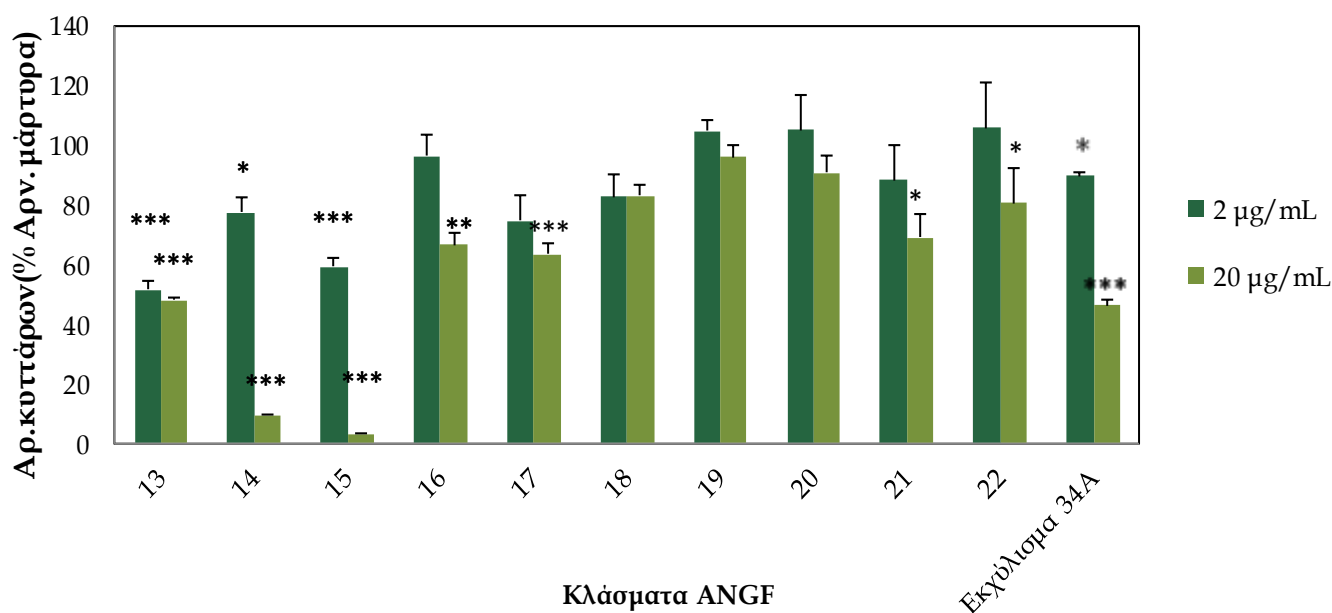


Διάγραμμα 6.2 Επίδραση των κλασμάτων ANGF (24-35) και του εκχυλίσματος 12A από το οποίο προέρχονται τα εξής κλάσματα, στον αριθμό στον EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα κύτταρα επώαστηκαν με ANGF ουσίες (συγκέντρωση 2μg/mL και 20 μg/mL) για 48 ώρες προτού εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. Οι αριθμοί των κυττάρων παρουσιάζονται ως % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 σε σχέση με τον μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± SEM

Παρατηρώντας το παραπάνω διάγραμμα συμπεραίνεται ότι υπάρχει μια διαφοροποίηση στις επιδράσεις των κλασμάτων που προέρχονται από το εκχύλισμα 12 A του φυτού *Nepeta orphanidea*. Η δράση πολλών κλασμάτων αυτής της ομάδας δεν συμβαδίζει με την δράση του εκχυλίσματος 12A. Συγκεκριμένα, το εκχύλισμα αυτό παρουσιάζει μια κυτταροτοξική δράση στα EA.hy926, επίδραση η οποία παρατηρείται μόνο στα κλάσματα 5 και 6. Εν αντιθέση, το 1,2 και 9 έχουν επαγωγική δράση, με μεγαλύτερο ποσοστό στην υψηλή συγκέντρωση. Ενώ τα κλάσματα 3,4 και 11 δεν έχουν καμία επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων EA.hy926. Τα κλάσματα τα οποία παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον σε αυτήν την ομάδα κλασμάτων είναι το 7,8,10,12 τα οποία παρουσιάζουν ανασταλτική δράση στον EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό, επομένως μπορεί και στην αγγειογένεση. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, συμπεραίνεται ότι τα κλάσματα 5 και 6 πιθανόν να είναι και τα πιο δραστικά αυτού του εκχυλίσματος αφού στην συνύπαρξή με τα υπόλοιπα κλάσματα, επικαλύπτουν την διαφορετική δράση τους επικρατώντας η τοξική επίδραση στα κύτταρα EA.hy926.

Πίνακας 6.3 Επίδραση των κλασμάτων ANGF (13-22) και του εκχυλίσματος 34A από το οποίο προέρχονται στον αριθμό των ενδοθηλιακών κυττάρων συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα

ANGF Κλάσματα	Συγκέντρωση (μg/mL)	Αρ. Κυττάρων (% Αρν. μάρτυρα)	% SEM	Mann-Whitney t-test	ANGF εκχυλίσματα Αρ. κυττάρων (% Αρν. μάρτυρα ±SEM)
ANGFfr 13	2	60,423	3,180	***	34A 89,62 ± 1,58 (2μg/mL) 52,59 ± 1,83 10μg/mL) 46,12 ± 2,28 (20μg/mL)
	20	56,782	1,079	***	
ANGFfr 14	2	85,535	4,285	*	
	20	5,728	0,367	***	
ANGFfr 15	2	68,559	3,251	***	
	20	0,000	0,626	***	
ANGFfr 16	2	96,552	7,126	ns	
	20	66,491	3,837	**	
ANGFfr 17	2	74,745	8,174	ns	
	20	63,605	3,517	***	
ANGFfr 18	2	82,837	7,701	ns	
	20	83,041	3,943	ns	
ANGFfr 19	2	104,892	3,440	ns	
	20	96,012	3,978	ns	
ANGFfr 20	2	105,324	11,782	ns	
	20	90,823	6,059	ns	
ANGFfr 21	2	88,472	11,883	ns	
	20	69,234	7,749	*	
ANGFfr 22	2	105,730	15,607	ns	
	20	80,667	11,966	*	



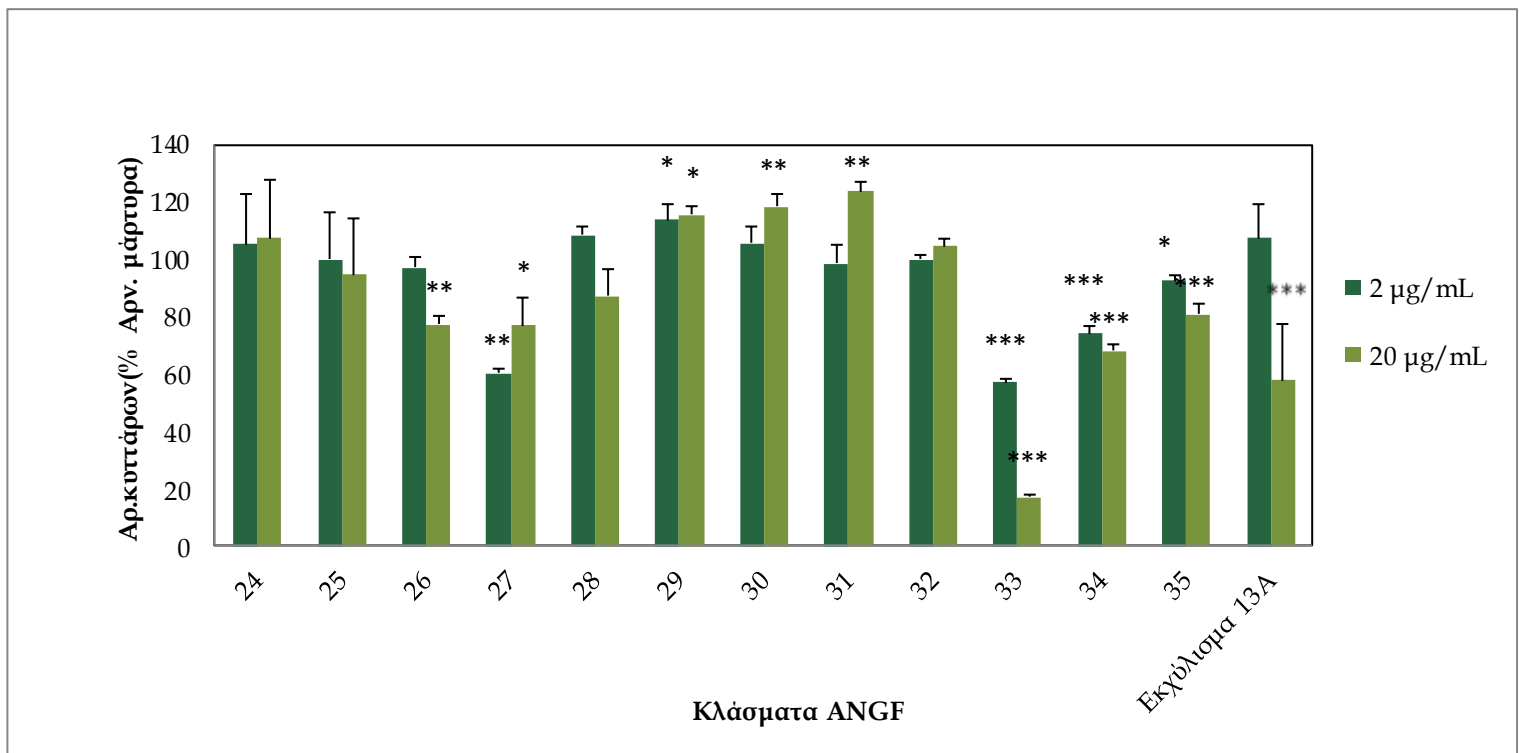
Διάγραμμα 6.3 Επίδραση των κλασμάτων ANGF (13-22) και του εκχυλίσματος 34 A από το οποίο προέρχονται τα εξής κλάσματα, στον αριθμό στον EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα κύτταρα επώαστηκαν με ANGF ουσίες (συγκέντρωση 2μg/ml και 20 μg/ml) για 48 ώρες προτού εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. Οι αριθμοί των κυττάρων παρουσιάζονται ως % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 σε σχέση με τον μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± SEM

Στην ομάδα αυτή των κλασμάτων, παρατηρείται μια πιο ομοιόμορφη δραστηριότητα στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των EA.hy926 σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Συγκρίνοντας τις επιδράσεις των επιμέρους κλασμάτων με την δράση του εκχυλίσματος 34 A, το οποίο λαμβάνεται από το φυτό *Inula pseudolimonella* διαπιστώνεται ότι η δράση του 70 % των κλασμάτων αυτών συμπίπτει με αυτή του εκχυλίσματος. Ειδικότερα, το 34 A προκαλεί μια ανασταλτική δράση στον EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό, γεγονός το οποίο παρατηρείται και με τα κλάσματα 13,16,17,14,15 και 21,22 αλλά όχι σε τόσο μεγάλο βαθμό. Παρόλα αυτά, πρέπει να σημειωθεί ότι μόνο η δράση του ANGF 13 ταυτίζεται απολύτως με το εκχύλισμα 34A, εφόσον είναι το μόνο κλάσμα το οποίο παρουσιάζει ανασταλτική δράση και στις δυο εξεταζόμενες συγκεντρώσεις. Τα υπόλοιπα κλάσματα (ANGF 18,19,20) δεν παρουσιάζουν κάποια επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Πίνακας 6.4 Επίδραση των κλασμάτων ANGF (24-35) και του εκχυλίσματος 34A από το οποίο προέρχονται, στον αριθμό των ενδοθηλιακών κυττάρων συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα.

ANGF Κλάσματα	Συγκέντρωση (μg/mL)	Αρ. Κυττάρων (% Αρν. μάρτυρα)	% SEM	Mann-Whitney t-test	ANGF εκχυλίσματα Αρ. κυττάρων (% Αρν. μάρτυρα ±SEM)
ANGFfr 24	2	105,305	17,354	ns	
	20	107,199	20,334	ns	
ANGFfr 25	2	100,031	16,299	ns	
	20	94,630	19,392	ns	
ANGFfr 26	2	97,205	3,469	ns	
	20	77,398	3,169	**	

ANGFfr 27	2	60,366	1,650	**	13A 107,28 ± 11,95 (2μg/mL) 63,85 ± 1,84(10μg/mL) 57,68 ± 19,77 (2μg/mL)
	20	76,921	9,627	*	
ANGFfr 28	2	108,534	2,647	ns	
	20	87,345	9,183	ns	
ANGFfr 29	2	113,663	5,272	*	
	20	115,577	2,620	*	
ANGFfr 30	2	105,570	5,871	ns	
	20	118,188	4,312	**	
ANGFfr 31	2	98,434	6,727	ns	
	20	123,632	3,050	**	
ANGFfr 32	2	99,777	1,983	ns	
	20	104,425	2,518	ns	
ANGFfr 33	2	57,099	1,388	***	
	20	17,169	0,699	***	
ANGFfr 34	2	74,073	2,723	***	
	20	68,031	2,617	***	
ANGFfr 35	2	92,482	1,866	*	
	20	80,923	3,243	***	

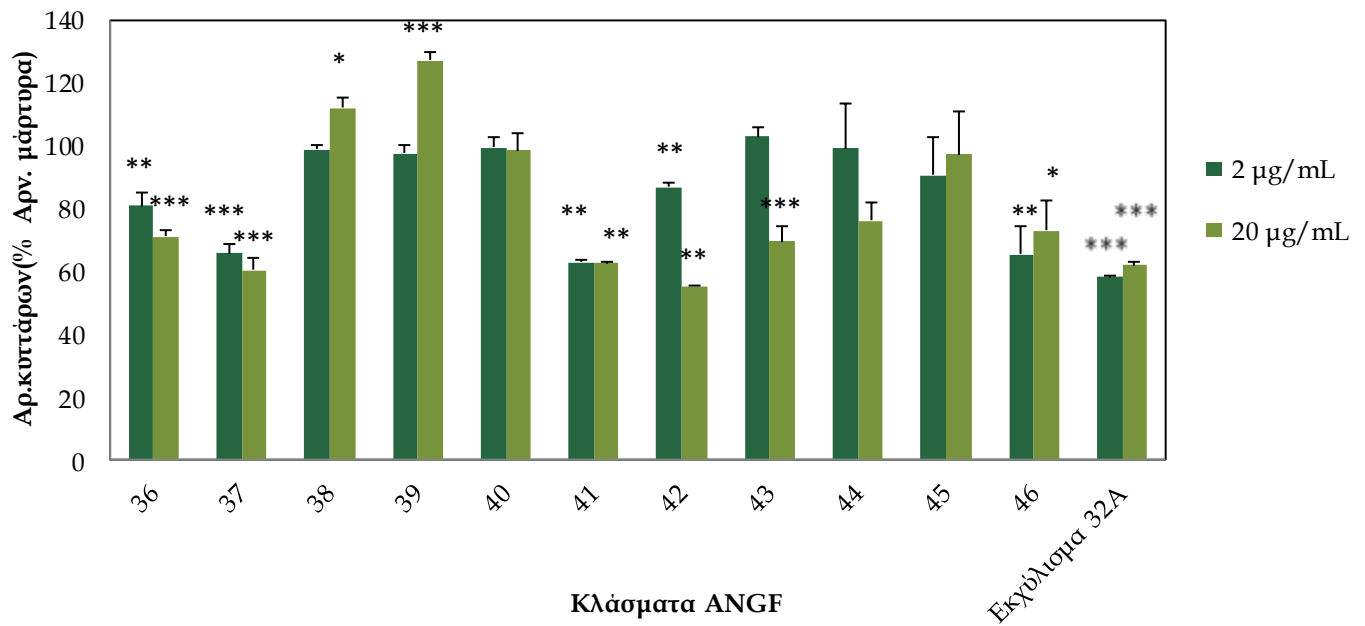


Διάγραμμα 6.4 Επίδραση των κλασμάτων ANGF (24-35) και του εκχυλίσματος 13 A από το οποίο προέρχονται τα εξής κλάσματα, στον αριθμό στον EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα κύτταρα επώαστηκαν με ANGF ουσίες (συγκέντρωση 2μg/ml και 20 μg/ml) για 48 ώρες προτού εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. Οι αριθμοί των κυττάρων παρουσιάζονται ως % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 σε σχέση με τον μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± SEM

Από το παραπάνω διάγραμμα διαπιστώνεται ότι υπάρχει μια γκάμα διαφορετικών επιδράσεων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των EA.hy926 σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Επίσης, παρατηρείται και μια διαφοροποίηση και σε σύγκριση με την δράση του εκχυλίσματος 13A το οποίο προέρχεται από το φυτό *Onobrychis ebeoides*. Συγκεκριμένα, αυτό επιφέρει ανασταλτική δράση στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αλλά μόνο στην υψηλή συγκέντρωση. Ένα κλάσμα παρουσιάζει αυτή την δράση (ANGF 26), ενώ γενικά το 40% των κλασμάτων παρουσιάζουν ανασταλτική δράση στον EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό (ANGF 33,34,35). Αντ' αυτού υπάρχουν και κλάσματα τα οποία προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (ANGF 29,30,31), ενώ δεν λείπουν και αυτά τα κλάσματα τα οποία δεν έχουν καμία σημαντική επίδραση στα EA.hy9269 (ANGF 24,25). Επομένως στο εκχύλισμα 13 A, υπάρχουν χαρακτηριστικές ενώσεις είτε με ανασταλτική είτε με επαγωγική δράση αλλά υπερτερούν αυτές που έχουν την τάση να μειώνουν το ρυθμό του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, έτσι δικαιολογείται και η παρατηρούμενη ανασταλτική δράση του.

Πίνακας 6.5 Επίδραση των κλασμάτων ANGF (36-46) και του εκχυλίσματος 32A από το οποίο προέρχονται, στον αριθμό των ενδοθηλιακών κυττάρων συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα.

ANGF Κλάσματα	Συγκέντρωση (μg/mL)	Αρ. Κυττάρων (% Αρν. μάρτυρα)	% SEM	Mann-Whitney t-test	ANGF εκχυλίσματα Αρ. κυττάρων (% Αρν. μάρτυρα ±SEM)
ANGFfr 36	2	80,7350	4,5237	**	32A 58,26 ± 0,69 (2μg/mL) 61,97 ± 1,26(20μg/mL)
	20	71,1496	1,7459	***	
ANGFfr 37	2	65,6990	3,0957	***	
	20	60,5826	3,6769	***	
ANGFfr 38	2	98,9419	1,3830	ns	
	20	112,0621	3,1214	*	
ANGFfr 39	2	97,5664	2,8591	ns	
	20	127,1926	2,6160	***	
ANGFfr 40	2	99,5768	3,1752	ns	
	20	98,5892	5,1816	ns	
ANGFfr 41	2	62,8597	0,8052	**	
	20	62,6771	0,4106	**	
ANGFfr 42	2	86,7711	1,4345	**	
	20	55,2664	0,4016	**	
ANGFfr 43	2	102,8732	3,1600	ns	
	20	69,5951	4,7925	***	
ANGFfr 44	2	99,1841	14,3559	ns	
	20	76,0461	6,1355	ns	
ANGFfr 45	2	90,5227	12,4107	ns	
	20	97,1466	13,6745	ns	
ANGFfr 46	2	65,3841	8,8988	**	
	20	73,0197	9,8511	*	

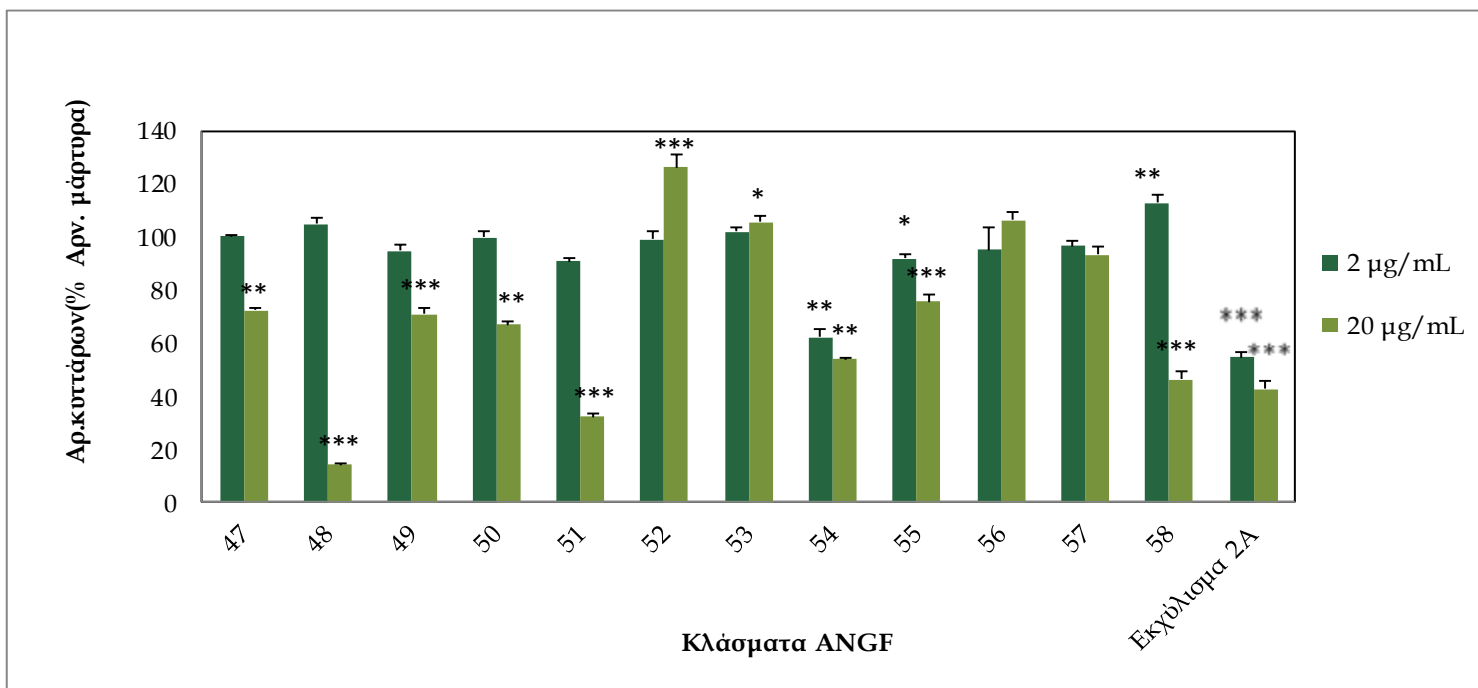


Διάγραμμα 6.5 Επίδραση των κλασμάτων ANGF (36-46) και του εκχυλίσματος 32 A από το οποίο προέρχονται τα εξής κλάσματα, στον αριθμό στον EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα κύτταρα επώαστηκαν με ANGF ουσίες (συγκέντρωση 2µg/ml και 20 µg/ml) για 48 ώρες προτού εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. Οι αριθμοί των κυττάρων παρουσιάζονται ως % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 σε σχέση με τον μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± SEM

Και σε αυτήν την ομάδα κλασμάτων παρατηρείται ότι υπάρχει μια διαφοροποίηση στις επιδράσεις των κλασμάτων από την επίδραση του ίδιου του εκχυλίσματος από το οποίο απομονώνονται. Το 32A λαμβάνεται από το φυτό *Daphne oleoides* και προκαλεί μια σημαντική ανασταλτική δράση στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό στη χαμηλή και στην υψηλή συγκέντρωση. Η επίδραση αυτή παρατηρείται σε μερικά από τα επιμέρους κλάσματα, με χαρακτηριστικό παράδειγμα το ANGF 36,37,41. Εν αντιθέση, τα ANGF 38,39 έχουν επαγωγική δράση και υπάρχουν και από αυτά που δεν έχουν καμία επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων EA.hy926. Και για αυτήν την ομάδα κλασμάτων συμπεραίνεται ότι είναι πιο δραστικά τα κλάσματα με ανασταλτική δράση στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αφού αυτή υπερτερεί και έχει ως αποτέλεσμα και το εκχύλισμα να έχει την εξής δράση στα EA.hy926.

Πίνακας 6.6 Επίδραση των κλασμάτων ANGF (47-58) και του εκχυλίσματος 2A από το οποίο προέρχονται, στον αριθμό των ενδοθηλιακών κυττάρων συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα

ANGF Κλάσματα	Συγκέντρωση (μg/mL)	Αρ. Κυττάρων (% Αρν. μάρτυρα)	% SEM	Mann-Whitney t-test	ANGF εκχυλίσματα Αρ. κυττάρων (% Αρν. μάρτυρα ±SEM)
ANGFfr 47	2	100,315	0,402	ns	2A 54,52 ± 2,25 (2μg/mL) 42,65 ± 2,98(20μg/mL)
	20	72,132	1,037	**	
ANGFfr 48	2	104,765	2,693	ns	
	20	13,880	0,955	***	
ANGFfr 49	2	94,758	2,192	ns	
	20	70,917	2,168	***	
ANGFfr 50	2	99,877	2,389	ns	
	20	66,875	1,482	**	
ANGFfr 51 dose-resp	2	90,841	1,173	ns	
	<u>10</u>	58,435	1,985	*	
	20	32,216	0,808	***	
ANGFfr 52	2	99,228	3,003	ns	
	20	126,287	4,670	***	
ANGFfr 53	2	101,885	1,440	ns	
	20	105,754	2,237	*	
ANGFfr 54	2	62,130	3,176	**	
	20	53,879	0,706	**	
ANGFfr 55	2	91,784	1,954	*	
	20	75,493	2,498	***	
ANGFfr 56	2	95,227	8,390	ns	
	20	106,466	3,043	ns	
ANGFfr 57	2	96,459	1,742	ns	
	20	93,380	3,322	ns	
ANGFfr 58	2	112,778	2,919	**	
	20	46,194	2,988	***	

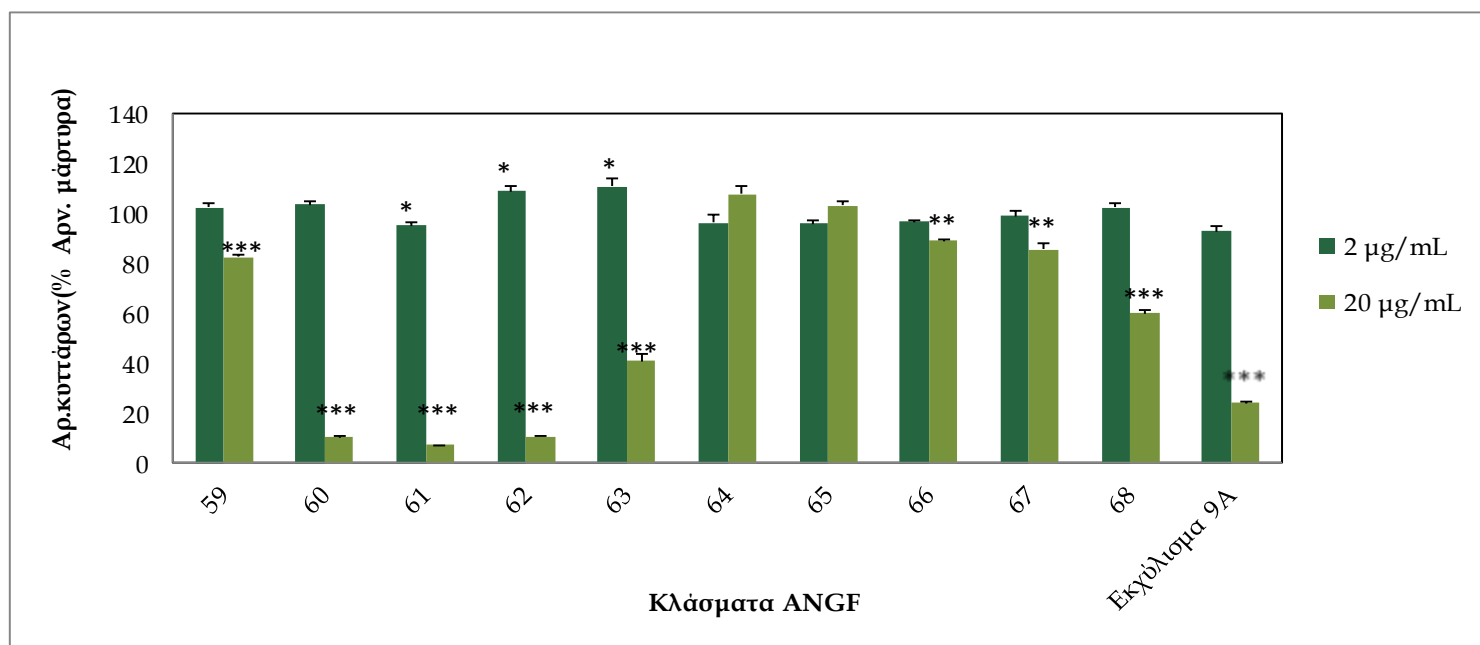


Διάγραμμα 6.6 Επίδραση των κλασμάτων ANGF (47-58) και του εκχυλίσματος 2 A από το οποίο προέρχονται τα εξής κλάσματα, στον αριθμό στον EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα κύτταρα επωάστηκαν με ANGF ουσίες (συγκέντρωση 2μg/ml και 20 μg/ml) για 48 ώρες προτού εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. Οι αριθμοί των κυττάρων παρουσιάζονται ως % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 σε σχέση με τον μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± SEM

Παρατηρώντας το παραπάνω διάγραμμα συμπεραίνεται ότι ποικίλουν οι τάσεις επίδρασης των κλασμάτων αυτών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των EA.hy926 σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Επίσης, παρατηρείται μια διαφοροποίηση και σε σύγκριση με την δράση του εκχύλισμα 2 A, το οποίο λαμβάνεται από το φυτό *Asphodeline lutea* και επιφέρει ανασταλτική δράση στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στις δυο εξεταζόμενες συγκεντρώσεις. Ένα μόνο κλάσμα παρουσιάζει την εν λόγω δράση, το (ANGF 54), ενώ γενικά ανασταλτική δράση στο EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό παρουσιάζει το 50% των κλασμάτων. Αντί αυτού υπάρχουν και κλάσματα τα οποία προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (ANGF 52,53) έχουν κυτταροτοξική δράση (ANGF 48,51) στα EA.hy926, ενώ δεν λείπουν και αυτά τα κλάσματα τα οποία δεν έχουν καμία σημαντική επίδραση στα EA.hy926 (ANGF 56,57). Στο συγκεκριμένο εκχύλισμα 13A, στο οποίο συνυπάρχουν ενώσεις με τελείως διαφορετικές δράσεις, υποθέτεται ότι γίνεται μια συνδυαστική επίδραση όλων των ουσιών αυτών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με αποτέλεσμα να μειωθεί ο ρυθμός του πολλαπλασιασμού των κυττάρων EA.hy926.

Πίνακας 6.7 Επίδραση των κλασμάτων ANGf (59-68) και του εκχυλίσματος 9A από το οποίο προέρχονται, στον αριθμό των ενδοθηλιακών κυττάρων συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα.

ANGF Κλάσματα	Συγκέντρωση (μg/mL)	Αρ. Κυττάρων (% Αρν. μάρτυρα)	% SEM	Mann-Whitney t-test	ANGF εκχυλίσματα Αρ. κυττάρων (% Αρν. μάρτυρα ±SEM)
ANGFfr 59	2	102,601	1,568		9A 93,20 ± 2,32 (2μg/mL) 4,10 ± 0,95 (2μg/mL)- τοξικό
	20	82,659	1,395		
ANGFfr 60	2	103,709	1,439		
	10 dose-resp	50,770	0,839		
ANGFfr 61	2	95,231	1,576		
	10 dose-resp	18,179	0,602		
ANGFfr 62	2	109,023	2,416		
	10 dose-resp	17,121	0,572		
ANGFfr 63	2	111,052	3,298		
	20	41,202	3,068		
ANGFfr 64	2	96,655	3,453		
	20	107,853	3,600		
ANGFfr 65	2	96,205	1,347		
	20	103,474	1,630		
ANGFfr 66	2	96,740	1,113		
	20	89,150	0,878		
ANGFfr 67	2	99,145	1,838		
	20	85,886	2,234		
ANGFfr 68	2	102,827	1,709		
	20	60,043	1,199		

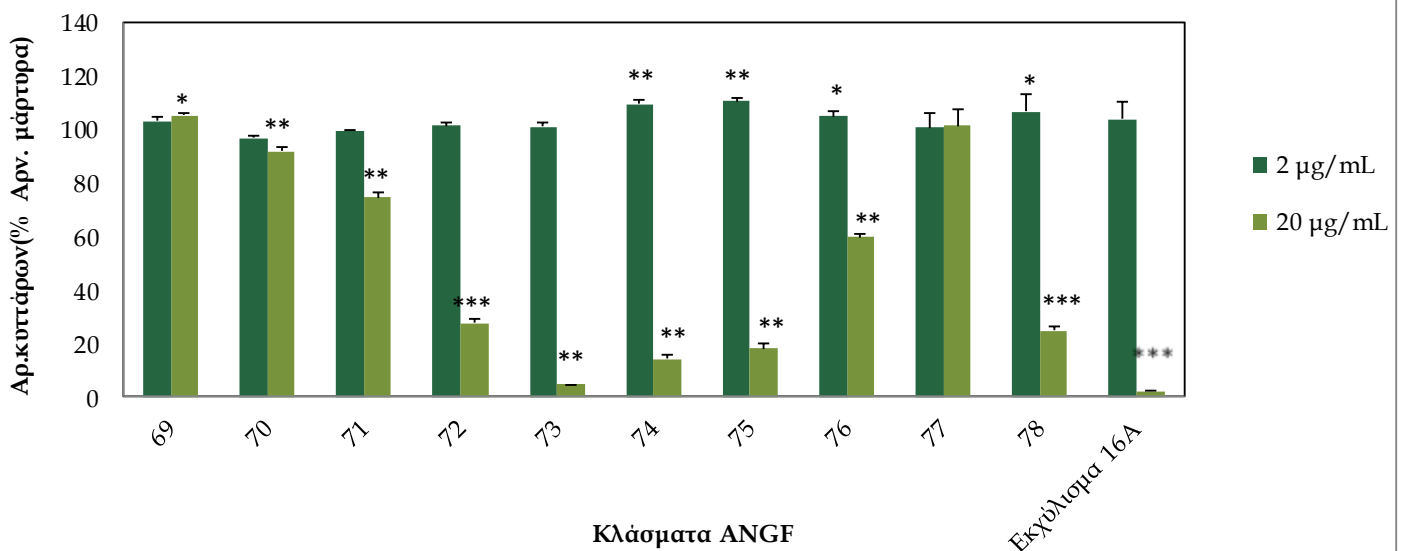


Διάγραμμα 6.7 Επίδραση των κλασμάτων ANGf (59-68) και του εκχυλίσματος 9A από το οποίο προέρχονται τα εξής κλάσματα, στον αριθμό στον EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα κύτταρα επώασησαν με ANGf ουσίες (συγκέντρωση 2μg/ml και 20 μg/ml) για 48 ώρες προτού εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. Οι αριθμοί των κυττάρων παρουσιάζονται ως % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 σε σχέση με τον μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± SEM.

Από το παραπάνω διάγραμμα γίνεται αντιληπτό ότι, από το εκχύλισμα 9A, το οποίο προέρχεται από το φυτό *Glycyrrhiza glabra* έχουν απομονωθεί κλάσματα με μια γκάμα διαφορετικών αντιδράσεων στον EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Από τα παραπάνω αποτελέσματα διαπιστώνεται ότι το ίδιο το εκχύλισμα παρουσιάζει κυτταροτοξική δράση στα EA.hy926, γεγονός το οποίο παρατηρείται σε ένα πολύ μικρό ποσοστό των κλασμάτων, της τάξης του 30% (ANGF : 60,61,62). Παρόλα αυτά, υποθέτεται ότι η δράση τους μπορεί να υπερτερεί των άλλων κλασμάτων και από την συνύπαρξη τους η κυτταροτοξική δράση να πλεονεκτεί και συνεπώς να παρατηρείται και στο εκχύλισμα του φυτού. Όσον αφορά την δράση των άλλων κλασμάτων, αυτά είτε παρουσιάζουν κάποια ανασταλτική δράση στην υψηλή συγκέντρωση (ANGF: 59,63,66,67,68), είτε δεν επιφέρουν κάποια επίδραση στον EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό (ANGF: 64, 65).

Πίνακας 6.8 Επίδραση των κλασμάτων ANGF (69-78) και του εκχυλίσματος 16 A από το οποίο προέρχονται, στον αριθμό των ενδοθηλιακών κυττάρων συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα.

ANGF Κλάσματα	Συγκέντρωση (μg/mL)	Αρ. Κυττάρων (% Αρν. μάρτυρα)	% SEM	Mann-Whitney t-test	ANGF εκχυλίσματα Αρ. κυττάρων (% Αρν. μάρτυρα ±SEM)
ANGFfr 69	2	103,426	1,675	***	152A 59,63 ± 2,81 (2μg/mL) 26,44 ± 0,82 (20μg/mL)- τοξικό
	20	105,353	1,208	**	
ANGFfr 70	2	96,874	1,209	ns	
	20	91,906	1,381	*	
ANGFfr 71	2	99,597	0,602	ns	
	20	74,698	1,566	*	
ANGFfr 72 dose-resp	2	101,433	1,069	**	
	<u>10</u>	108,602	3,519	**	
	20	27,497	1,954	**	
	2	101,030	1,930	***	
ANGFfr 73	<u>10</u>	3,675	0,355	***	
	20	4,598	0,171	***	
ANGFfr 74 dose-resp	2	109,594	1,690	ns	
	<u>10</u>	30,362	6,187	ns	
	20	14,257	1,365	**	
	2	110,761	1,192	***	
ANGFfr 75	20	18,175	1,534	ns	
	2	105,098	1,866	ns	
ANGFfr 76 dose-resp	<u>10</u>	65,476	6,659	***	
	20	59,820	1,040	**	
ANGFfr 77	2	100,709	5,808	ns	
	20	101,638	5,921	*	
ANGFfr 78 dose-resp	2	106,845	6,313	ns	
	<u>10</u>	78,208	1,601	*	
	20	24,964	1,264	**	



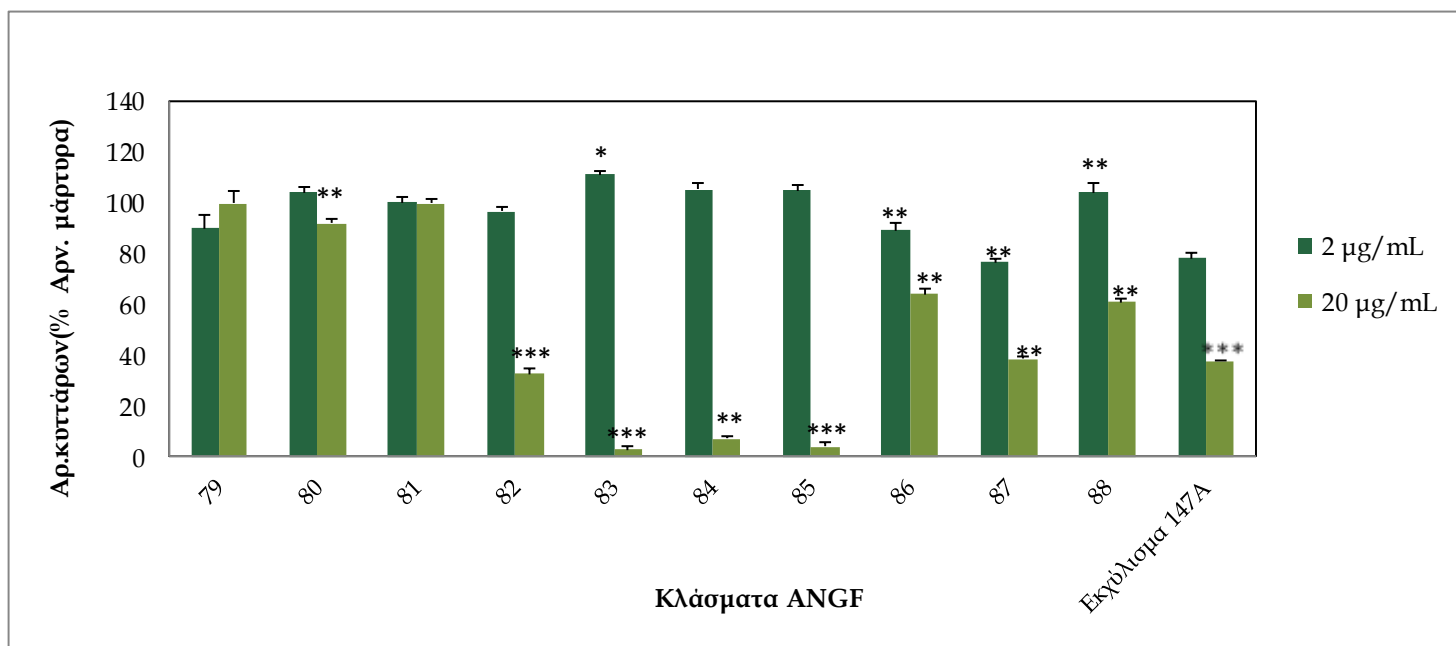
Διάγραμμα 6.8 Επίδραση των κλασμάτων ANGF (69-78) και του εκχυλίσματος 16 A από το οποίο προέρχονται τα εξής κλάσματα, στον αριθμό στον EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα κύτταρα επώαστηκαν με ANGF ουσίες (συγκέντρωση 2µg/ml και 20 µg/ml) για 48 ώρες προτού εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. Οι αριθμοί των κυττάρων παρουσιάζονται ως % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 σε σχέση με τον μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± SEM

Παρατηρώντας το Διάγραμμα 6.8 διαπιστώνεται η έντονη κυτταροτοξική δράση της τάξης περίπου του 95%, του εκχυλίσματος 16 A που λαμβάνεται από το φυτό *Salvia argentea*. Η δράση αυτή παρατηρείται και στην πλειονότητα των εξεταζόμενων κλασμάτων αυτής της ομάδας, με χαρακτηριστικό παράδειγμα το κλάσμα ANGF 73. Τα υπόλοιπα κλάσματα είτε παρουσιάζουν κάποια ανασταλτική δράση χωρίς όμως να μειώνουν των κυτταρικό πολλαπλασιασμό κάτω του 50%, είτε τον προάγουν, είτε δεν εμφανίζουν κάποια επίδραση στα EA.hy926, σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι τα κλάσματα 5 και 6 πιθανόν να είναι και τα πιο δραστικά αυτού του εκχυλίσματος αφού στην συνύπαρξή με τα υπόλοιπα κλάσματα, επικαλύπτουν την διαφορετική δράση τους επικρατώντας η τοξική επίδραση στα κύτταρα EA.hy926.

Πίνακας 6.9 Επίδραση των κλασμάτων ANGF (79-88) και του εκχυλίσματος 147 A από το οποίο προέρχονται, στον αριθμό των ενδοθηλιακών κυττάρων συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα.

ANGF Κλάσματα	Συγκέντρωση (µg/mL)	Αρ. Κυττάρων (% Αρν. μάρτυρα)	% SEM	Mann-Whitney t-test	ANGF εκχυλίσματα Αρ. κυττάρων (% Αρν. μάρτυρα ±SEM)
ANGFfr 79	2	89,826	5,459	ns	147 A 78,02 ±2,26 (2µg/ mL) 37,77 ± 0,20 (20µg/mL)
	20	99,714	5,226	ns	
ANGFfr 80	2	103,892	2,129	ns	
	20	91,845	1,594	**	
ANGFfr 81	2	100,175	1,775	ns	
	20	99,650	1,542	ns	
ANGFfr 82	2	96,526	1,706	ns	
	20	32,676	1,846	***	
ANGFfr 83	2	111,012	1,419	*	
	20	2,727	1,408	***	
ANGFfr 84	2	105,134	2,699	ns	

	20	7,261	0,751	**
ANGFfr 85	2	104,960	1,844	ns
	20	4,164	1,325	***
ANGFfr 86	2	89,254	2,609	**
	20	64,195	1,693	**
ANGFfr 87	2	76,529	1,433	**
	20	38,379	0,816	**
ANGFfr 88	2	104,075	3,663	**
	20	61,020	1,342	**

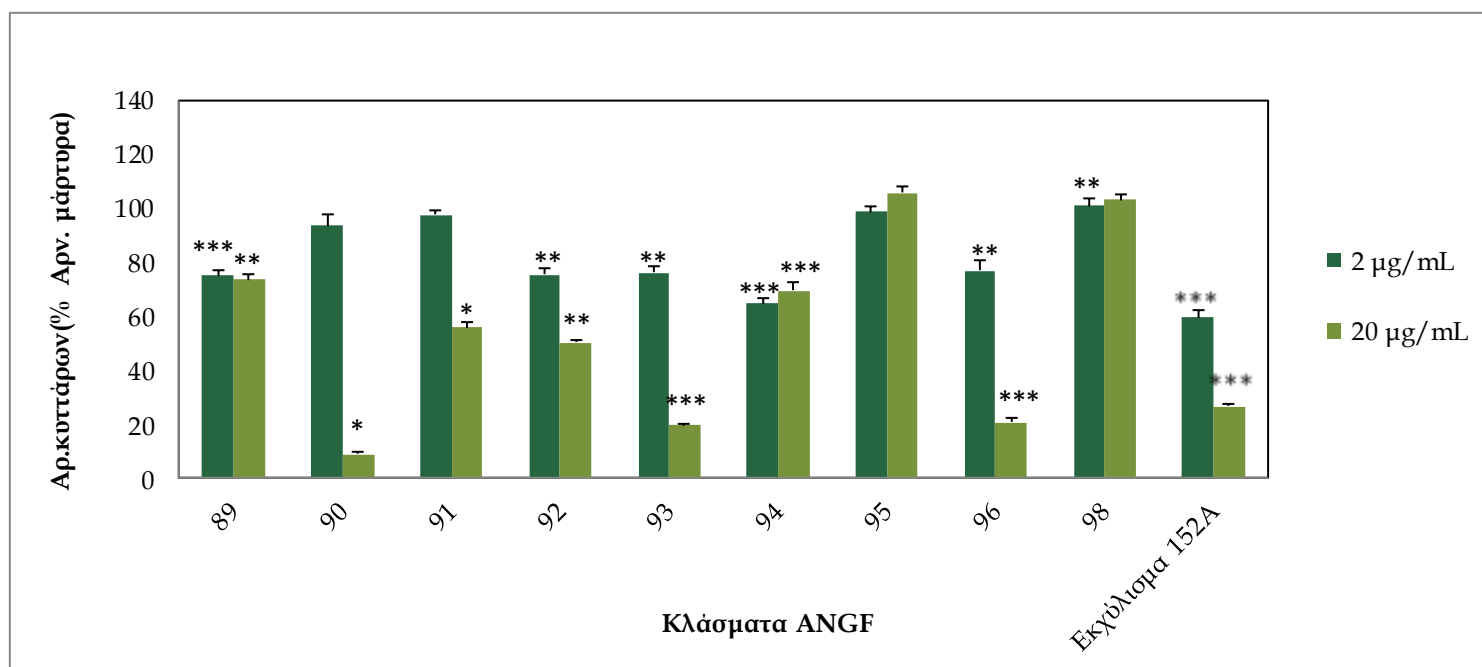


Διάγραμμα 6.9 Επίδραση των κλασμάτων ANGF (79-88) και του εκχυλίσματος 147 A από το οποίο προέρχονται τα εξής κλάσματα, στον αριθμό στον EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα κύτταρα επωάστηκαν με ANGF ουσίες (συγκέντρωση 2μg/ml και 20 μg/ml) για 48 ώρες προτού εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. Οι αριθμοί των κυττάρων παρουσιάζονται ως % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 σε σχέση με τον μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± SEM

Παρατηρώντας το παραπάνω διάγραμμα συμπεραίνεται ότι, ποικίλουν οι επιδράσεις των κλασμάτων αυτών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των EA.hy926 σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Επίσης, και σε αυτήν την ομάδα ενώσεων παρατηρείται μια διαφοροποίηση σε σύγκριση με την δράση του εκχυλίσματος 147A, το οποίο λαμβάνεται από το φυτό *Bupleurum fruticosum* και επιφέρει ανασταλτική δράση στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Μόνο 40 % των κλασμάτων παρουσιάζουν την εν λόγω δράση, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τα κλάσματα ANGF: 86,87. Επιπλέον, υπάρχουν και κλάσματα που παρουσιάζουν κυτταροτοξική δράση στα EA.hy926 όπως τα ANGF: 83,85 ενώ δεν λείπουν και αυτά τα κλάσματα τα οποία δεν έχουν καμία σημαντική επίδραση στα EA.hy926 (ANGF 79,81). Στο συγκεκριμένο εκχύλισμα 147A, στο οποίο συνυπάρχουν ενώσεις με τελείως διαφορετικές δράσεις, υποθέτεται ότι γίνεται μια συνδυαστική επίδραση όλων των ουσιών αυτών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με αποτέλεσμα να μειωθεί ο ρυθμός του πολλαπλασιασμού των κυττάρων EA.hy926.

Πίνακας 6.10 Επίδραση των κλασμάτων ANGf (89-98) και του εκχυλίσματος 152 A από το οποίο προέρχονται, στον αριθμό των ενδοθηλιακών κυττάρων συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα

ANGF Κλάσματα	Συγκέντρωση (μg/mL)	Αρ. Κυττάρων (% Αρν. μάρτυρα)	% SEM	Mann-Whitney t-test	ANGF εκχυλίσματα Αρ. κυττάρων (% Αρν. μάρτυρα ±SEM)
ANGFfr 89	2	74,875	1,924	***	152 A 59,63 ± 2,81 (2μg/mL) 26,44 ± 0,82 (20μg/mL)- τοξικό
	20	73,366	1,970	**	
ANGFfr 90	2	93,558	4,170	ns	
	20	8,747	1,294	*	
ANGFfr 91	2	97,725	1,333	ns	
	20	55,970	2,104	*	
ANGFfr 92	2	75,345	2,164	**	
	20	50,209	1,272	**	
ANGFfr 93	2	76,071	2,660	**	
	20	19,703	0,671	***	
ANGFfr 94	2	64,764	1,739	***	
	20	69,620	3,222	***	
ANGFfr 95	2	98,748	1,836	ns	
	20	105,683	2,375	ns	
ANGFfr 96	2	76,977	4,051	**	
	20	20,721	1,829	***	
ANGFfr 97	2	100,800	2,977	ns	
	20	102,995	2,140	ns	
ANGFfr 98	2	74,875	1,924	***	
	20	73,366	1,970	**	



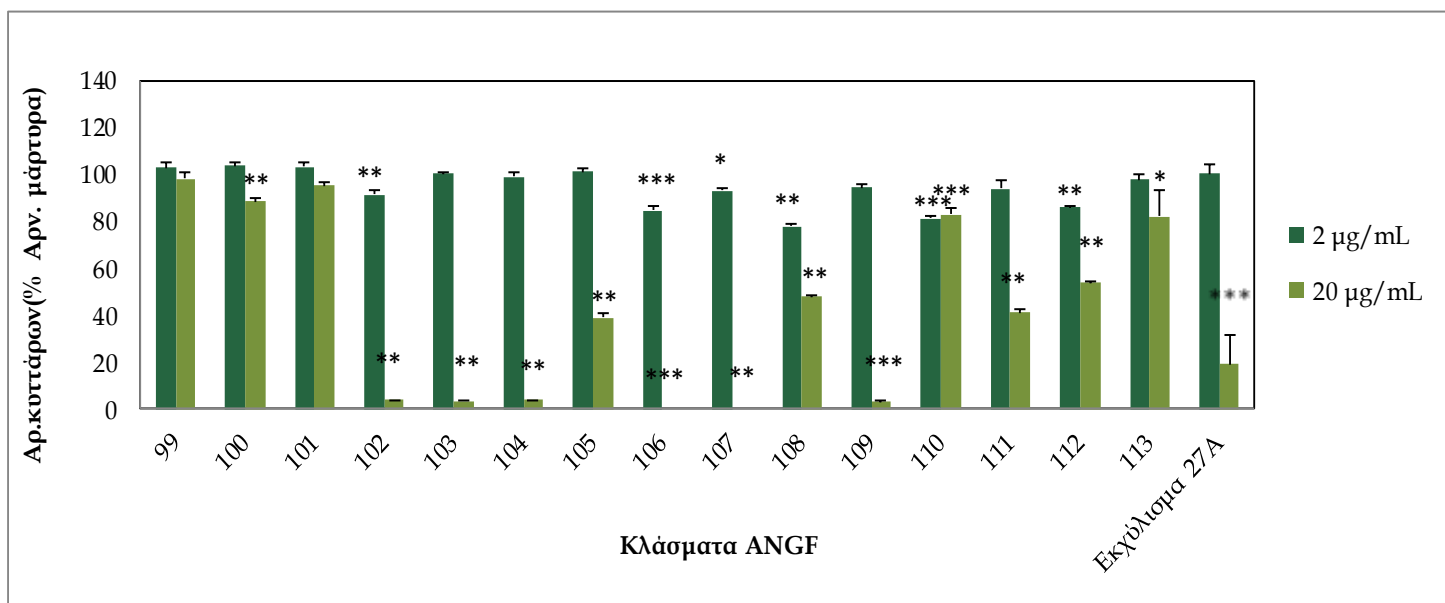
Διάγραμμα 6.10 Επίδραση των κλασμάτων ANGf (89-98) και του εκχυλίσματος 152 A από το οποίο προέρχονται τα εξής κλάσματα, στον αριθμό στον EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα κύτταρα επώασηκαν με ANGf ουσίες (συγκέντρωση 2μg/ml και 20 μg/ml) για 48 ώρες προτού εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. Οι αριθμοί των κυττάρων παρουσιάζονται ως % ποσοστό του

αρνητικού μάρτυρα. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 σε σχέση με τον μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± SEM

Παρατηρώντας το Διάγραμμα 6.10 γίνεται αντιληπτή η έντονη ανασταλτική δράση του εκχυλίσματος 152A στη χαμηλή συγκέντρωση και η κυτταροτοξική δράση στην υψηλή. Το εκχύλισμα αυτό προέρχεται από φυτό *Laserpitium pseudomeum* και μπορεί μόνο δυο (ANGF 93,96) από τα επιμέρους εξεταζόμενα κλάσματα να παρουσιάζουν την ίδια δράση με αυτό. Ωστόσο, υπάρχουν και μερικά κλάσματα τα οποία έχουν ανασταλτική δράση είτε μόνο στην υψηλή (ANGF 91) είτε και στις δυο εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (ANGF: 89,92,94), ενώ δεν λείπουν τα κλάσματα με κυτταροτοξική στα EA.hy926 (ANGF 90) ή δεν παρουσιάζουν κάποια δράση στον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων (ANGF 95).

Πίνακας 6.11 Επίδραση των κλασμάτων ANGF (99-113) και του εκχυλίσματος 27A από το οποίο προέρχονται, στον αριθμό των ενδοθηλιακών κυττάρων συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα.

ANGF Κλάσματα	Συγκέντρωση (μg/mL)	Αρ. Κυττάρων (% Αρν. μάρτυρα)	% SEM	Mann-Whitney t-test	ANGF εκχυλίσματα Αρ. κυττάρων (% Αρν. μάρτυρα ±SEM)
ANGFfr 99	2	102,957	2,527	ns	27 A 100,19 ± 4,51 (2μg/mL) 62,24 ± 1,39(10μg/mL) 18,91 ± 12,37(20μg/mL)- τοξικό
	20	97,961	2,727	ns	
ANGFfr 100	2	103,487	1,257	ns	
	20	88,535	1,656	**	
ANGFfr 101	2	103,214	1,641	ns	
	20	95,359	1,555	ns	
ANGFfr 102	2	91,203	2,435	**	
	<u>10</u>	4,193	0,307	**	
	20	3,846	0,086	**	
ANGFfr 103	2	100,327	0,833	ns	
	<u>10</u>	3,731	0,098	**	
	20	3,230	0,254	**	
ANGFfr 104	2	99,095	1,899	ns	
	20	3,615	0,112	**	
ANGFfr 105	2	101,245	1,761	ns	
	20	38,730	2,196	**	
ANGFfr 106	2	84,808	1,304	***	
	20	0,000	0,143	***	
ANGFfr 107	2	93,236	0,548	*	
	20	0,000	0,103	**	
ANGFfr 108	2	78,004	0,891	**	
	20	47,752	0,455	**	
ANGFfr 109	2	94,447	1,425	ns	
	20	2,932	0,335	***	
ANGFfr 110	2	81,268	1,311	***	
	20	82,786	2,991	***	
ANGFfr 111	2	94,090	3,699	ns	
	20	41,153	1,461	**	
ANGFfr 112	2	85,697	1,055	**	
	20	53,704	1,002	**	
ANGFfr 113	2	97,709	2,108	ns	
	20	82,040	10,939	*	



Διάγραμμα 6.11 Επίδραση των κλασμάτων ANGF (99-113) και του εκχυλίσματος 27 Α από το οποίο προέρχονται τα εξής κλάσματα, στον αριθμό στον EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα κύτταρα επωάστηκαν με ANGF ουσίες (συγκέντρωση 2µg/ml και 20 µg/ml) για 48 ώρες προτού εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. Οι αριθμοί των κυττάρων παρουσιάζονται ως % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα. *P<0.05;**P<0.01;***P<0.001 σε σχέση με τον μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± SEM

Από το παραπάνω διάγραμμα γίνεται αντιληπτό ότι, από το εκχύλισμα 27A, το οποίο προέρχεται από το φυτό *Amelanchier parviflora*, έχουν απομονωθεί κλάσματα με ποικίλη δράση στον EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Το ίδιο το εκχύλισμα παρουσιάζει κυτταροτοξική δράση στα EA.hy926, δράση η οποία παρατηρείται σε ένα πολύ μικρό ποσοστό των κλασμάτων, της τάξης του 20% (ANGF: 103,104,109). Παρόλα αυτά, υπάρχουν και μερικά κλάσματα τα οποία παρουσιάζουν κυτταροτοξική δράση στην υψηλή συγκέντρωση και ανασταλτική στην χαμηλή (ANGF 102,106,107). Επίσης, υπάρχουν κλάσματα με ανασταλτική δράση είτε στην υψηλή συγκέντρωση, είτε και στις δυο, ενώ δεν λείπουν και αυτά τα κλάσματα τα οποία δεν επιδρούν στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

6.1.1 Κατηγοριοποίηση εξεταζόμενων κλασμάτων ANGF.

Βάσει της επίδρασης των κλασμάτων φυτικών εκχυλισμάτων στον πολλαπλασιασμό της ενδοθηλιακής κυτταρικής σειράς EA.hy926, δηλαδή την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, να προκαλούν κυτταροτοξικότητα ή να επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, κατατάσσονται σε τέσσερις κατηγορίες.

1. Κλάσματα με ανασταλτική δράση
2. Κλάσματα με κυτταροτοξική δράση
3. Κλάσματα με επαγωγική δράση
4. Κλάσματα με μη σημαντική δράση

Κάθε κατηγορία διαιρείται σε υποκατηγορίες ανάλογα με τη συγκέντρωση της ουσίας στην οποία παρατηρήθηκε δραστηριότητα.

1. ANGF κλάσματα με ανασταλτική δράση στον EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό

Τα κλάσματα αυτά μειώνουν το ρυθμό του πολλαπλασιασμού των κυττάρων EA.hy926 στο τρυβλίο σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα και ενδεχομένως να έχουν αντι-αγγειογενετική δράση. Η συγκεκριμένη κατηγορία υποδιαιρείται στις τρεις εξής υποκατηγορίες:

1α. Κλάσματα που αναστέλλουν σημαντικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό τόσο στη χαμηλή (2 μg/mL) όσο και στην υψηλή συγκέντρωση (20 μg/mL) χωρίς να μειώνουν τον κυτταρικό αριθμό στη χαμηλή συγκέντρωση σε λιγότερο από 50%, σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα κλάσματα που ανήκουν στην κατηγορία αυτή παρουσιάζονται παρακάτω. Κλάσματα ANGF: 12,13, 27,34,35, 36, 37,41,42,46,54,55,86,89,92,94,108,110,112 Τα κλάσματα τα οποία ξεχωρίζουν σε αυτήν την κατηγορία είναι τα κάτωθι: Τα κλάσματα ANGF 13 και 54, τα οποία αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό κατά περίπου 40% στη χαμηλή συγκέντρωση και περίπου 45% στην υψηλή συγκέντρωση, τα κλάσματα ANGF 37 και 41, τα οποία αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό περίπου 35% στη χαμηλή συγκέντρωση και περίπου 40% στην υψηλή συγκέντρωση και το κλάσμα 87, το οποίο μπορεί να αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μόνο 23% στη χαμηλή συγκέντρωση, αλλά στην υψηλή συγκέντρωση το ποσοστό αυτό κυμαίνεται στο 60 %.

1β. Κλάσματα που προκαλούν μια σημαντική αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μόνο στην υψηλή συγκέντρωση. Παρακάτω παρατίθενται οι ουσίες που ανήκουν στην κατηγορία αυτή. Κλάσματα ANGF: 7,8,10, 16,17,21,22,26,43,47,49,50,58,59,63,66,67,68,70 71,76,80,88,91,100,111,113.

Οι πιο χαρακτηριστικές ενώσεις αυτής της ομάδας είναι:

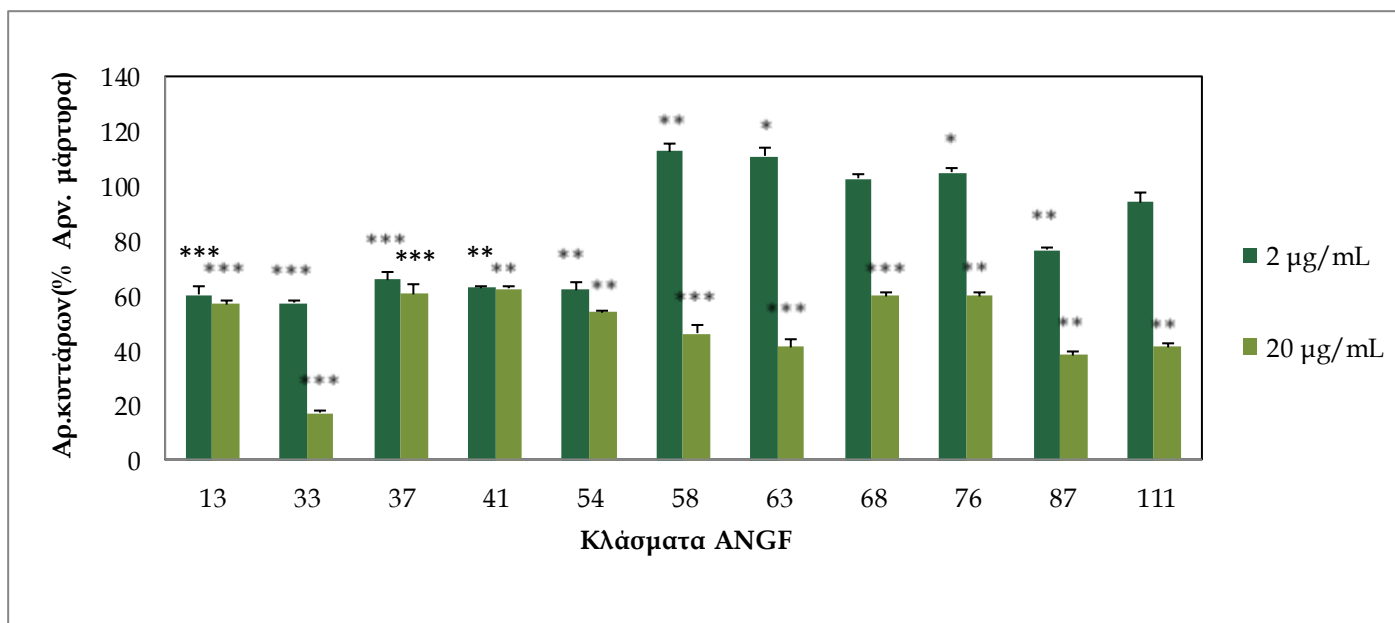
Τα ANGF: 63,111 που προκάλεσαν μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού κατά περίπου 60%, το ANGF 58 που προκάλεσε μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού της τάξης του 50% και τα ANGF: 68,76 που επιφέρουν μια μείωση που κυμαίνεται στο 40 % σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα.

1γ. Κλάσματα τα οποία εμφανίζουν μια σημαντική επίδραση στην μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στη χαμηλή συγκέντρωση χωρίς να μειώσουν των αριθμών των κυττάρων περισσότερο από 50% σε σύγκριση με τον μάρτυρα, ωστόσο προκαλούν τοξικότητα στην υψηλή συγκέντρωση. Τα κλάσματα αυτά είναι τα εξής:

Κλάσματα ANGF: 14,15, 33,93,96,102,106,107

Ενδεικτικά, το πιο δραστικά κλάσματα της ομάδας αυτής είναι τα ANGF 33, το οποίο αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό περίπου 45% στη χαμηλή συγκέντρωση, ενώ παρουσιάζει τοξικότητα στην υψηλή συγκέντρωση.

Στο παρακάτω διάγραμμα παρατίθενται μερικά από τα πιο χαρακτηριστικά κλάσματα με ανασταλτική δράση στον EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό.



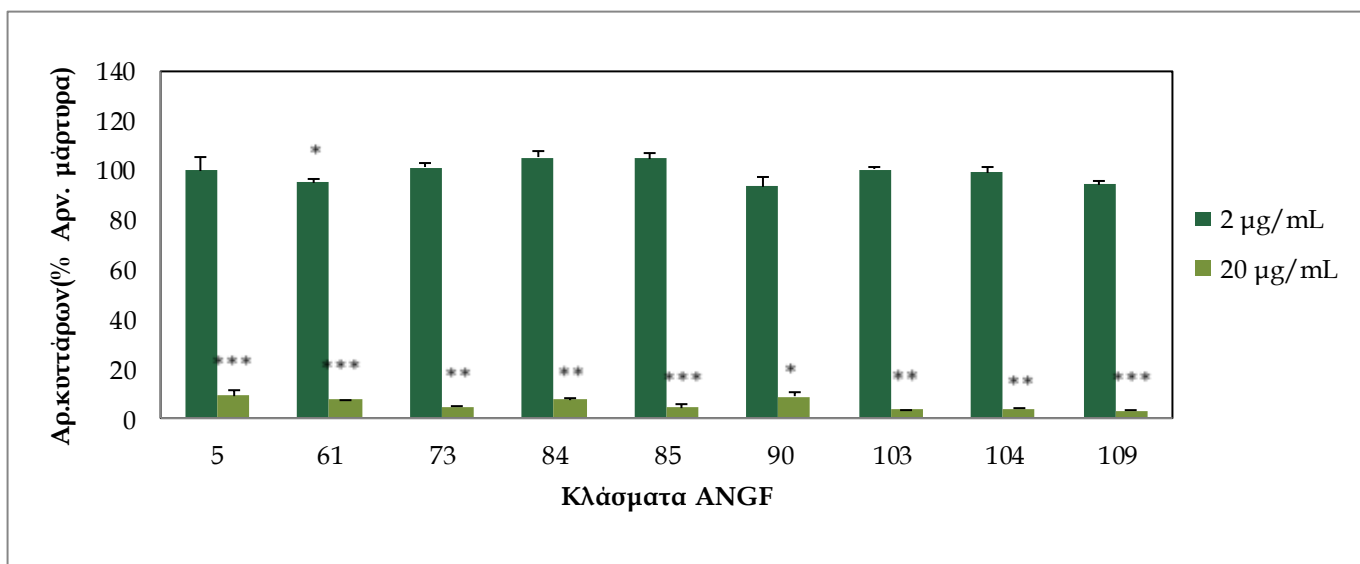
Διάγραμμα 6.12 Ουσίες ANGF με ανασταλτική δράση στον EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα κύτταρα επώαστηκαν με ANGF ουσίες (συγκέντρωση 2µg/ml και 20 µg/ml) για 48 ώρες προτού εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. Οι αριθμοί των κυττάρων παρουσιάζονται ως % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα . *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± SEM

2. ANGF κλάσματα με κυτταροτοξική δράση στα EA.hy926

Τα κλάσματα αυτά χαρακτηρίζονται ως τοξικά εφόσον προκαλούν μείωση του κυτταρικού αριθμού σε λιγότερο από του εναρκτήριου κυτταρικού αριθμού επιστροφής, (στην συγκεκριμένη περίπτωση 4000 κύτταρα ανά φρεάτιο). Συγκεκριμένα, στην κατηγορία αυτή συμπεριλαμβάνονται τα κλάσματα τα οποία δεν επηρεάζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στη χαμηλή συγκέντρωση (2µg/mL), αλλά προκαλούν τοξικές επιδράσεις στην υψηλή (20µg/mL). Τα κλάσματα αυτά παρατίθενται παρακάτω.

Κλάσματα ANGF: 5,6,48,51,60,61,62,72,73,74,75,78,82,83,84,85,90,103,104,105,109

Στη ομάδα αυτή ξεχωρίζουν τα κλάσματα ANGF: 5,61,73,84,85,90,103 και 109 τα οποία αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε ένα ποσοστό της τάξης 90 με 98 % στην υψηλή συγκέντρωση σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα. Στο παρακάτω Διάγραμμα θα παρουσιαστούν ενδεικτικά οι πιο δραστικές ενώσεις αυτής της υποκατηγορίας.



Διάγραμμα 6.13 Ουσίες ANGF με κυτταροτοξική δράση στον EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα κύτταρα επωάστηκαν με ANGF ουσίες (συγκέντρωση 2μg/ml και 20 μg/ml) για 48 ώρες προτού εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. Οι αριθμοί των κυττάρων παρουσιάζονται ως % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± SEM

3. ANGF κλάσματα με επαγωγική δράση στον EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό

Στην κατηγορία αυτή κατατάσσονται κλάσματα τα οποία θεωρείται ότι λειτουργούν κυτταροπροστατευτικά ή/και αυξάνουν το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων EA.hy926 στο τρυβλίο και άρα έχουν πιθανή προ-αγγειογενετική δράση. Η συγκεκριμένη κατηγορία υποδιαιρείται στις δυο εξής υποκατηγορίες:

3α. Κλάσματα που προκαλούν σημαντική επαγωγική δράση τόσο στην χαμηλή όσο και στην υψηλή συγκέντρωση. Τα κλάσματα που συμπεριλαμβάνονται σε αυτήν την κατηγορία είναι τα εξής:

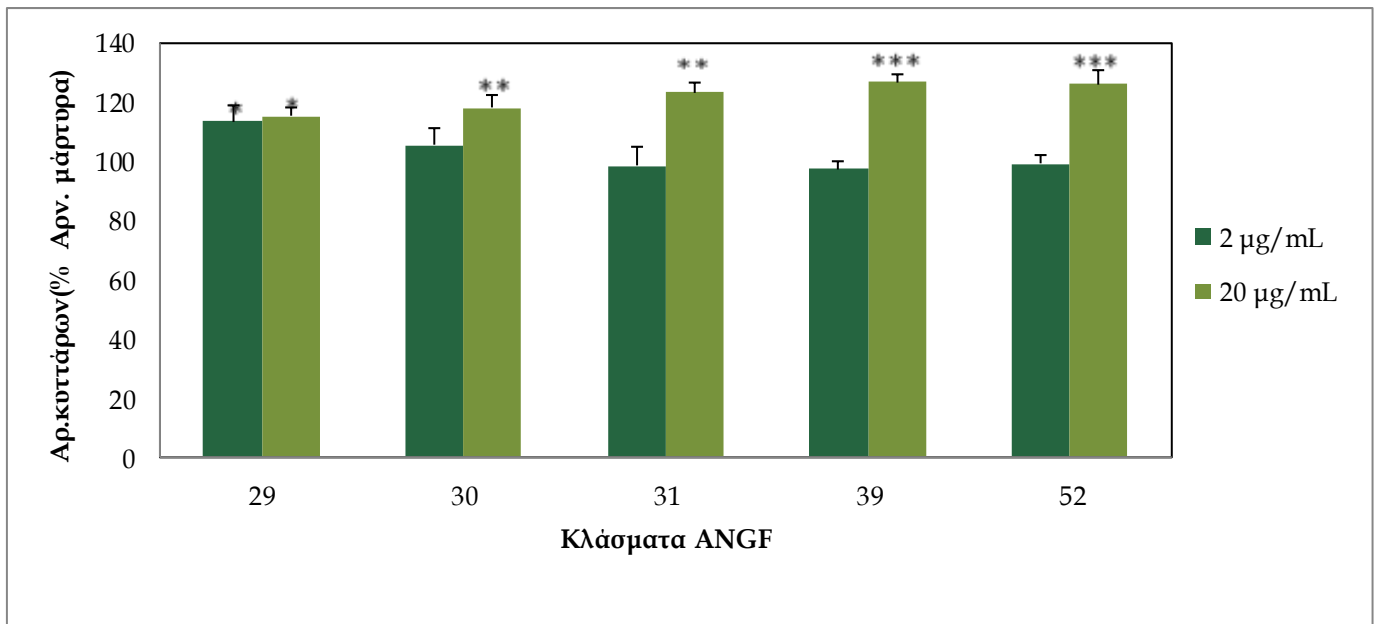
Κλάσματα ANGF: 2,29

3β. Κλάσματα που προκαλούν μια σημαντική επαγωγή δράση σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα μόνο στην υψηλή συγκέντρωση. Τα κλάσματα αυτά είναι οι κάτωθι:

Κλάσματα ANGF: 1,9,30,31,38,39,52,53, 69

Στη υποκατηγορία αυτή ξεχωρίζουν τα κλάσματα ANGF: 39 και 52 τα οποία προκάλεσαν αύξηση του κυτταρικού αριθμού στην υψηλή συγκέντρωση κατά περίπου 30% και τα κλάσματα ANGF: 30 και 31 που προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στην υψηλή συγκέντρωση κατά περίπου 20% σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα κλάσματα αυτά μπορεί να θεωρηθούν και κλάσματα με την υψηλότερη πιθανή προ-αγγειογενετική δράση.

Τα χαρακτηριστικά κλάσματα αυτής της κατηγορία παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα.



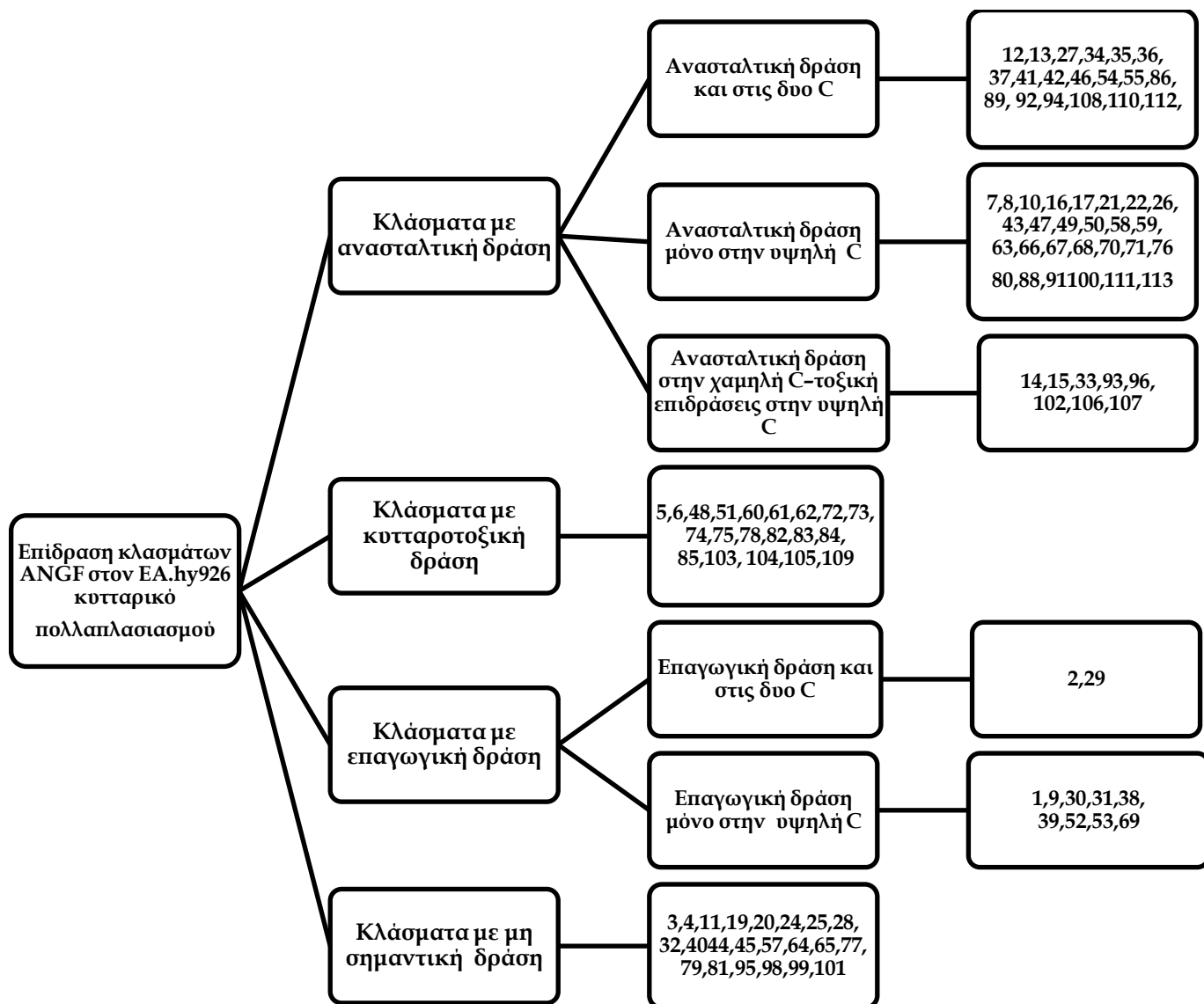
Διάγραμμα 6.14 Ουσίες ANGF με επαγωγική δράση στον EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα κύτταρα επώαστηκαν με ANGF ουσίες (συγκέντρωση 2μg/ml και 20 μg/ml) για 48 ώρες προτού εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. Οι αριθμοί των κυττάρων παρουσιάζονται ως % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± SEM

4. ANGF κλάσματα με μη σημαντική επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων EA.hy926

Τα κλάσματα αυτά δεν επιδρούν ούτε επαγωγικά ούτε ανασταλτικά στο ρυθμό του πολλαπλασιασμού των κυττάρων EA.hy926 στο τρυβλίο, σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα και ενδεχομένως δεν έχουν κάποια αγγειογενετική δράση. Επομένως δεν ενδείκνυται κάποια μετέπειτα απομόνωση επιμέρους ουσιών των συγκεκριμένων κλασμάτων και φυσικά η εξέταση της επίδρασης τους στο ρυθμό του πολλαπλασιασμού ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα κλάσματα αυτά παρατίθενται παρακάτω.

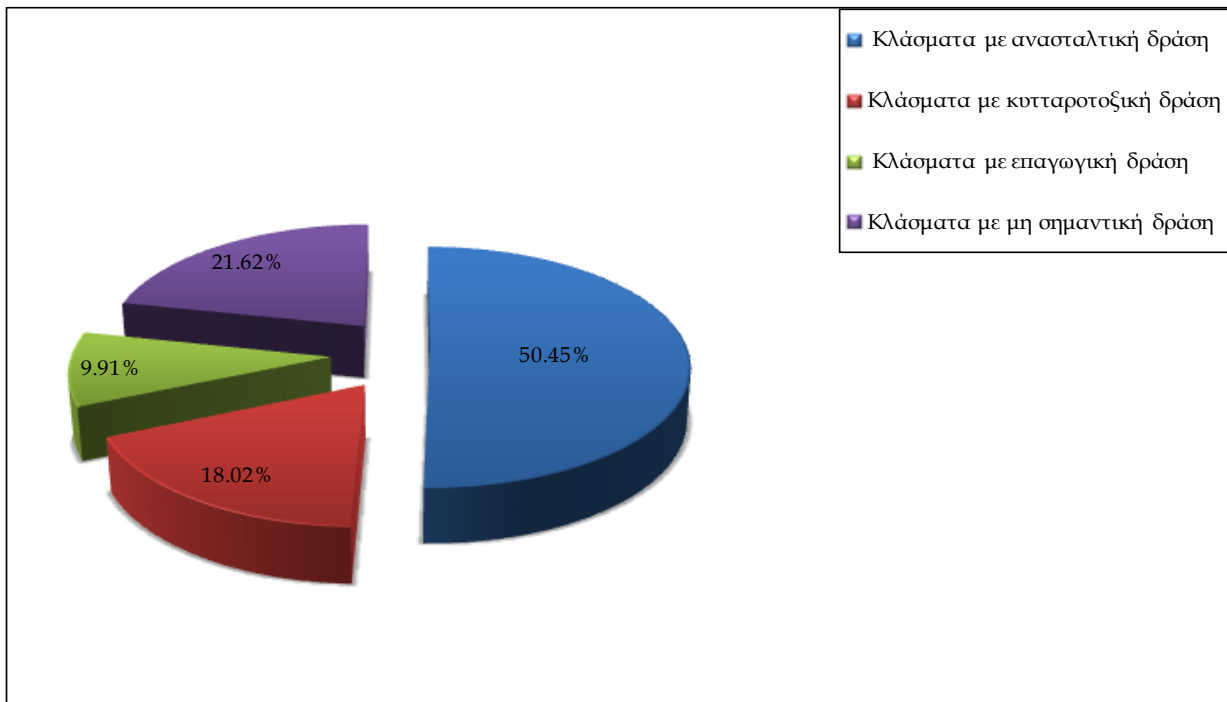
Κλάσματα ANGF: 3,4,11,19,20,24,25,28,32,40,44,45,56,57,64,65,77,79,81,95,98,99,101.

Η παραπάνω ταξινόμηση, παρουσιάζεται σε ένα συγκεντρωτικό διαγράμματα κατηγοριοποίησης των εξεταζόμενων κλασμάτων φυτικών εκχυλισμάτων, με βάση την επίδραση τους στον πολλαπλασιασμό της ενδοθηλιακής κυτταρικής σειράς EA.hy926.



Σχήμα 6.1 Κατηγοριοποίηση των εξεταζόμενων κλασμάτων ANGF

Ενώ στην συνέχεια, παρατίθεται ένα διάγραμμα πίτας στο οποίο παρουσιάζεται το ποσοστό εξεταζόμενων κλασμάτων που εμφανίζουν οι τέσσερις κυριότερες αναφερθείσες δράσεις.



Διάγραμμα 6.15 Ποσοστιαία κατηγοριοποίηση της δράσης των εξεταζόμενων κλασμάτων

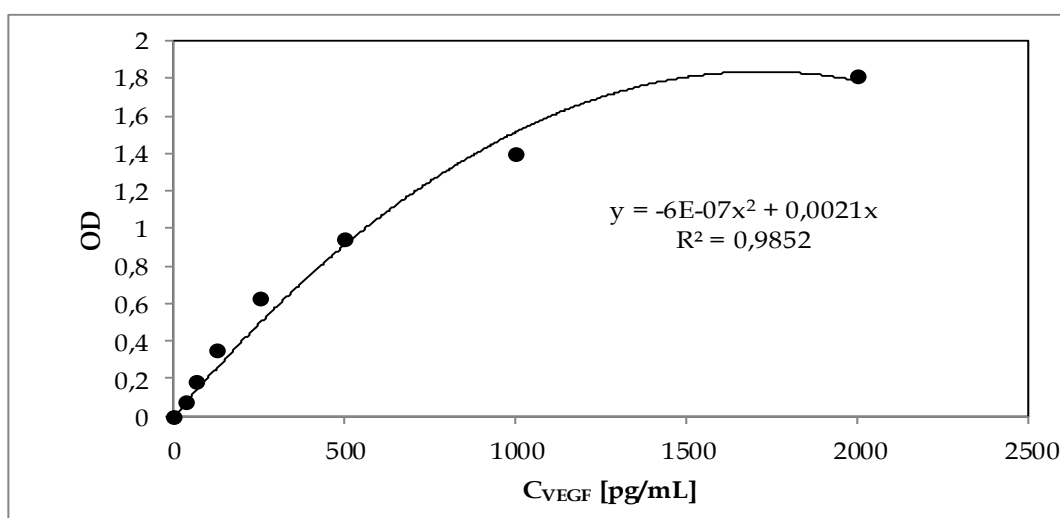
Παρατηρώντας το παραπάνω διάγραμμα συμπεραίνεται ότι πάνω από το ήμισυ των εξεταζόμενων κλασμάτων ANGF παρουσίασαν ανασταλτική δράση στον EA.hy926 κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ενδεχομένως να έχουν αντι-αγγειογενετική δράση. Συνεπώς, ενδέχεται από τα κλάσματα αυτά να απομονωθούν καθαρές φυσικές ενώσεις, οι οποίες εκ νέου θα υποβληθούν σε έλεγχο όσον αφορά την ικανότητά τους να αναστέλλουν ή να επάγουν την αγγειογένεση. Αντ' αυτού, περίπου το 20% των κλασμάτων δεν εμφανίζουν σημαντική επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων EA.hy926, και πιθανών να μην παρουσιάσουν και κάποια αγγειογενετική δράση. Ως εκ τούτου, τα κλάσματα αυτά δεν παρουσιάζουν κάποιο ενδιαφέρον, επομένως και δεν θα υποβληθούν σε περαιτέρω έλεγχο. Επίσης, ούτε τα κλάσματα με κυτταροτοξική δράση δεν θεωρούνται ιδιαίτερος σημαντικά. Μπορεί μεν να αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αλλά προκαλούν τέτοια μείωση του αριθμού, από το εναρκτήριο κυτταρικό αριθμό επιστροφής, που με λίγα λόγια σημαίνει ότι τα κλάσματα αυτά προκαλούν μια εξολοκλήρου καταστροφή των κυττάρων. Το γεγονός αυτό δεν είναι επιθυμητό, εφόσον δεν ζητείται ο κυτταρικός θάνατος όλων των κυττάρων αλλά η παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού τους. Όσον αφορά το 9% των εξεταζόμενων κλασμάτων, τα οποία προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενδέχεται να παρουσιάσουν κάποια προ-αγγειογενετική δράση. Αυτός είναι ο λόγος που παρουσιάζουν ενδιαφέρον για εφαρμογή σε παθολογικές καταστάσεις (π.χ. ισχαιμίες) όπου είναι επιθυμητή η δημιουργία νέων αγγείων.

6.2 Επίδραση καθαρών φυτικών ενώσεων στην έκκριση του VEGF από καρκινικά κύτταρα Her3B

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης που πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο ELISA εκφράστηκαν ως επί τοις % της συγκέντρωσης του εκκρινόμενου VEGF στον αρνητικό μάρτυρα, δηλαδή υπερκείμενα των εξεταζόμενων καρκινικών κυττάρων που δεν έχουν υποστεί κάποια θεραπεία. Ως εκ τούτου, οι τιμές οπτικής πυκνότητας που έχουν καταγραφεί πρέπει να μετατραπούν σε συγκεντρώσεις του εκκρινόμενου VEGF από υπερκείμενα καλλιέργειας καρκινικών κυττάρων που έχουν υποστεί θεραπεία με διάφορες φυτικές ενώσεις και έπειτα να εκφραστούν ως επί τοις % της συγκέντρωσης του εκκρινόμενου VEGF στον αρνητικό μάρτυρα. Η μετατροπή αυτή πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια μιας πρότυπης καμπύλη αναφοράς. Συγκεκριμένα, στον άξονα y της εν λόγω καμπύλης αναπαρίστανται οι τιμές οπτικής πυκνότητας πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης και στον άξονα x η συγκέντρωση VEGF. Ενώνοντας τα σημεία προκύπτει η πρότυπη καμπύλη. Από την τιμή οπτικής πυκνότητας του εκάστοτε δείγματος που λαμβάνεται στο τέλος της ELISA, μέσω της πρότυπης καμπύλης, υπολογίζεται η συγκέντρωση του παράγοντα VEGF. Παρακάτω παρουσιάζεται σε πινακαποιημένη μορφή ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα ζευγών τιμών οπτικής πυκνότητας και συγκεντρώσεων και η αντίστοιχη κατασκευαζόμενη καμπύλη αναφοράς.

Πίνακας 6.12 Ζεύγη τιμών οπτικής πυκνότητας πρότυπων δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης VEGF και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις.

Συγκέντρωση VEGF (pg/mL)	Απορρόφηση OD
0	0
31,25	0,0800
62,5	0,1828
125	0,3520
250	0,6311
500	0,9489
1000	1,4007
2000	1,8123

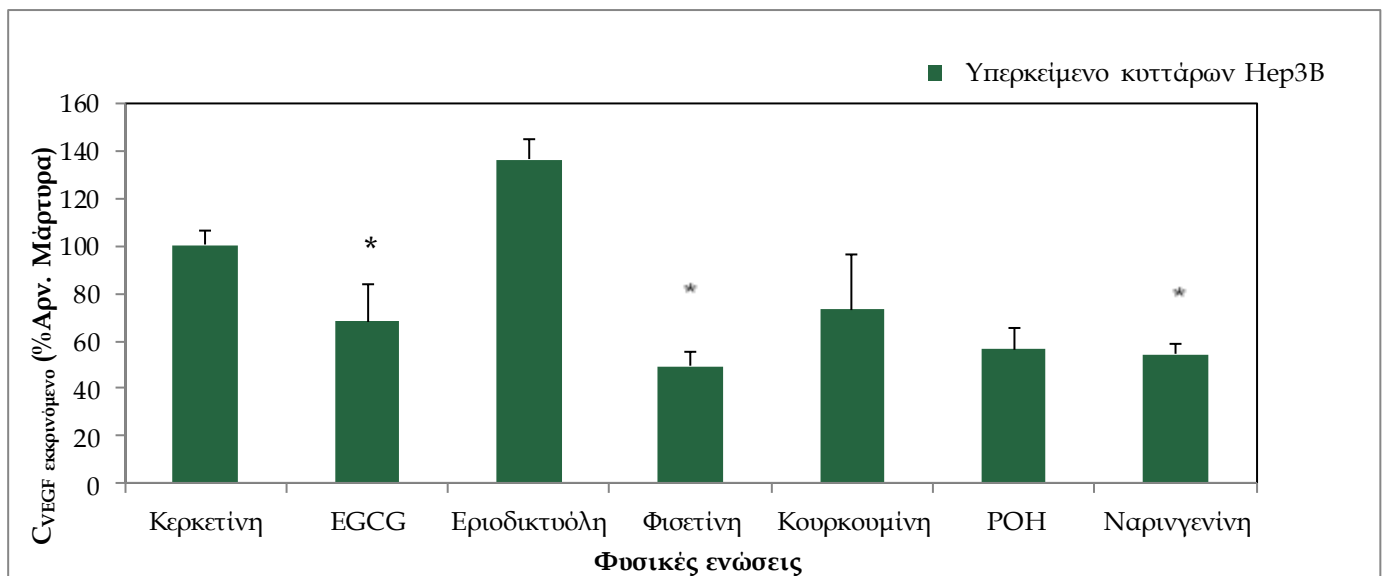


Διάγραμμα 6.16 Παράδειγμα πρότυπης καμπύλης για τον ποσοτικό προσδιορισμό του δείγματος.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε πνακοποιημένη μορφή ενώ στην συνέχεια ακολουθεί διάγραμμα, στο οποίο απεικονίζονται συγκεντρωτικά οι επιδράσεις των εξεταζόμενων καθαρών φυτικών ενώσεων στα επίπεδα εκκρινόμενου VEGF στα υπερκείμενα των κυττάρων, επομένως και στην αγγειογένεση.

Πίνακας 6.13 Επίδραση φυσικών ενώσεων στα επίπεδα εκκρινόμενου VEGF στο υπερκείμενο κυττάρων Her3B συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα

Υπερκείμενο κυττάρων Her3B							
Φυσικές Ενώσεις	Κερκετινή	EGCG	Εριοδικτυόλη	Φισετινή	Κουρκουμίνη	ΡΟΗ	Ναρινγενίνη
C_{VEGF} εκκρινόμενο (% Αρν. Μάρτυρα)	100,297	68,006	136,279	49,433	73,173	56,444	54,363
% SEM	5,894	16,272	8,803	6,159	23,351	8,960	4,169
Mann-Whitney t-test	ns	*	ns	*	ns	ns	*



Διάγραμμα 6.17 Επίδραση φυσικών ενώσεων στα επίπεδα εκκρινόμενου VEGF, στα υπερκείμενα κυττάρων Her3B, συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Οι συγκεντρώσεις εκκρινόμενου VEGF παρουσιάζονται ως επί τοις % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα. * $P < 0.05$ σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή \pm SEM.

Από την στατιστική ανάλυση διαπιστώνεται ότι στην κυτταρική σειρά Her3B, σημείωσαν στατιστική σημαντικότητα μόνο τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις ενώσεις: γαλλικό άλας της επιγαλλοκατεχίνης (EGCG), φισετινή και ναρινγενίνη. Επομένως, συμπεραίνεται ότι οι φυσικές ενώσεις αυτές μείωσαν σημαντικά τα επίπεδα έκκρισης του VEGF στο υπερκείμενο κυττάρων Her3B. Συγκεκριμένα, το γαλλικό άλας της επιγαλλοκατεχίνης και η φισετινή προκάλεσαν μια μείωση της τάξης περίπου του 30% και η ναρινγενίνη περίπου του 45% συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Επομένως, οι ουσίες αυτές πιθανόν να εμφανίζουν και κάποια ανασταλτική δράση στην επαγόμενη από τα καρκινικά κύτταρα αγγειογένεση.

7 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Σε αυτήν την ενότητα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την ανάλυση αποτελεσμάτων όπως παρουσιάστηκαν παραπάνω. Επιπρόσθετα, παρατίθενται κάποιες προτάσεις για μελλοντικά πειράματα που ενδεχομένως θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν για την εύρεση καθαρών ενώσεων που δρουν στην αγγειογένεση.

7.1 Συμπεράσματα

Στον συστηματικό έλεγχο που πραγματοποιήθηκε σε 111 επιμέρους κλάσματα δραστικών εκχυλισμάτων, τα οποία έχουν απομονωθεί από φυτά της ελληνικής χλωρίδας, σε σχέση με την ικανότητά τους να επηρεάζουν την αγγειογένεση, βρέθηκε ότι περίπου το 50% των εξεταζόμενων κλασμάτων ANGF παρουσίασαν ανασταλτική δράση στον πολλαπλασιασμό της ενδοθηλιακής κυτταρικής σειράς EA.hy926. Εφόσον, τα ενδοθηλιακά κύτταρα συγκροτούν τα αγγεία και παρουσιάζουν κυρίαρχο ρόλο στη διαδικασία της αγγειογένεσης, τότε κάθε διαφοροποίηση στον πολλαπλασιασμό τους ενδέχεται να επιδρά και στην διαδικασία της αγγειογένεσης. Ως εκ τούτου, τα κλάσματα με ανασταλτική δράση πιθανότατα να εμφανίζουν αντι-αγγειογενετική δράση. Ξεχωρίζουν τα φυτά *Inula pseudolimonella*, *Amelanchier parviflora*, *Daphne oleoides*, *Asphodeline lutea*, *Glycyrrhiza glabra* καθώς το μεγαλύτερο ποσοστό των κλασμάτων που απομονώθηκαν από αυτά παρουσίασαν ανασταλτική δράση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επιπλέον, τα πιο δραστικά κλάσματα (ANGF: 13, 37, 41, 54, 58, 63, 68, 111) απομονώθηκαν από τα εκχυλίσματα αυτών των φυτών. Η βιβλιογραφική έρευνα έδειξε ότι οι χαρακτηριστικές ενώσεις που περιέχονται στα παραπάνω φυτά ανήκουν σε δύο μεγάλες κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών, τα τερπένια και τις πολυφαινολικές ενώσεις, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τα φλαβονοειδή, τις ανθρακινόνες και τις λιγνάνες. Επομένως, υποθέτεται ότι οι καθαρές ενώσεις που θα απομονωθούν σε επόμενα στάδια αυτής της μελέτης από τα δραστικά κλάσματα να ανήκουν σε αυτές τις κατηγορίες μεταβολιτών. Συμπερασματικά, τα κλάσματα αυτά και ειδικότερα τα πιο δραστικά εξ αυτών, τα οποία προκαλούν μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού περίπου κατά το ήμισυ, πληρούν όλες τις προϋποθέσεις ώστε να υποβληθούν σε μετέπειτα μελέτες με σκοπό την εύρεση καθαρών ενώσεων με ανασταλτική δράση στην αγγειογένεση.

Επίσης, βρέθηκε ότι περίπου το 20% των κλασμάτων δεν εμφανίζουν σημαντική επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, και πιθανώς να μην παρουσιάσουν κάποια αγγειογενετική δράση. Συνεπώς, τα κλάσματα αυτά δεν θα υποβληθούν σε περαιτέρω ελέγχους αφού δεν παρουσιάζουν κάποιο ερευνητικό ενδιαφέρον. Επιπρόσθετα, το 18% των κλασμάτων που εμφανίζουν κυτταροτοξική δράση, δεν παρουσιάζουν κάποιο έντονο ενδιαφέρον, εφόσον καταστρέφουν ολοκληρωτικά τα κύτταρα. Όσον αφορά τα κλάσματα με επαγωγική δράση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, επομένως και στην αγγειογένεση, βρέθηκε ότι αποτελούν το 9% του συνόλου.

Εν τέλει, όσον αφορά το πρώτο μέρος της διπλωματικής εργασίας, πρέπει να σημειωθεί ότι όλα τα φυτά περιέχουν κάποιο κλάσμα με ανασταλτική δράση, ενώ οι υπόλοιπες δράσεις (επαγωγική, κυτταροξοτική και με μη σημαντική επίδραση) εμφανίζονται μόνο σε ορισμένα φυτά.

Αναφορικά, με το δεύτερο σκέλος τις διπλωματικής αυτής εργασίας, όπου διερευνήθηκε η επίδραση επτά καθαρών ενώσεων φυτικής προέλευσης στην αγγειογένεση, συμπεραίνεται ότι οι φυτικές ενώσεις γαλλικό άλας της επιγαλλοκατεχίνης, φισετίνη και ναρινγκενίνη είναι ικανές να μειώνουν σημαντικά τα επίπεδα έκκρισης του VEGF στο υπερκείμενο κυττάρων Her3B και κατά συνέπεια, οι ενώσεις αυτές ενδέχεται να αναστέλλουν την επαγόμενη αγγειογένεση από τα Her3B κύτταρα, μια υπόθεση που αναμένεται να διευκρινιστεί σε μελλοντικά πειράματα.

Συνοψίζοντας, δεν υπάρχει αμφιβολία ότι τα φυτικής προέλευσης προϊόντα αποτελούν μία νέα δυναμική κατηγορία ρυθμιστών της αγγειογένεσης με αποτέλεσμα ένα μεγάλο μέρος ερευνητικής δραστηριότητας να έχει επικεντρωθεί στη μελέτη αυτών

7.2 Προοπτικές

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί ένα πολύ μικρό βήμα στην προσπάθεια εξέτασης νέων φυσικών προϊόντων φυτικής προέλευσης που ενδέχεται να παρουσιάσουν κάποια δράση στην αγγειογένεση. Λόγω της συμμετοχής της αγγειογένεσης σε πολλά νοσήματα, όπως ο καρκίνος, υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη ενώσεων που μπορούν να επηρεάσουν την διαδικασία της αγγειογένεσης. Με τη ολοκλήρωση αυτής της εργασίας αξίζει να αναφερθούν κάποιες υλοποιήσιμες προτάσεις για μελλοντική έρευνα.

- ο Συστηματικός έλεγχος καθαρών φυσικών ενώσεων που θα απομονωθούν από τα δραστικά κλάσματα των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων, με στόχο την απομόνωση μορίων με προ- ή αντι-αγγειογενετικές ιδιότητες.
- ο Επέκταση των *in vitro* πειραματικών μοντέλων προσομοίωσης της ανάπτυξης των ενδοθηλιακών κυττάρων σε *in vivo* μοντέλα αγγειογένεσης σε πειραματόζωα.
- ο Πραγματοποίηση μοριακών μελέτων ώστε να βρεθεί ο μηχανισμός δράσης των δραστικών μορίων σε κυτταρικό επίπεδο.
- ο Προσπάθεια σύνθεσης ενώσεων που αποτελούν δομικά ανάλογα των φυσικών βιοδραστικών ενώσεων με πιθανά βελτιωμένες βιολογικές η/και φαρμακοκινητικές ιδιότητες όσον αφορά την αγγειογένεση.
- ο Πραγματοποίηση προκλινικών και στη συνέχεια κλινικών μελετών με σκοπό από τις δραστικές μεμονωμένες ενώσεις να αναπτυχθούν νέα φάρμακα

Βιβλιογραφία

- [1] David J. Newman and Gordon M. Cragg, 2012, Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010, *J Nat Prod.* March 23; 75(3), pp: 311-335
- [2] Terence Beghyn, Rebecca Deprez- Poulain, Nicolas Willand, Benoit Folleas and Benoit Deprez, 2008, Natural Compounds: Leads or Ideas? *Bioinspired Molecules for Drug Discovery* Chemical Biology and Drug Design, Vol 72, Issue 1, pp 3-15
- [3] Kritika Kesarwani, Rajiv Gupta, 2013, Bioavailability enhancers of herbal origin: An overview, *Asian Pac J Trop Biomed*; 3(4), pp: 253-266
- [4] Fabio Carmona, Ana Maria Soares Pereira, 2013, Herbal medicines: old and new concepts, truths and misunderstandings, *Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J. Pharmacogn* 23(2) pp: 379-385
- [5] Kayo Yoshimatsu, 2008, Tissue culture of medicinal plants: Micropropagation, transformation and production of useful secondary metabolite, *Studies in Natural Products Chemistry*, Volume 34, pp: 647-752
- [6] Michael Wink, 2010, *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*, Second Edition, Annual plant reviews, Volume 40, United Kingdom, Wiley-Blackwell
- [7] Lattanzio, V., Cardinali, A. and Linsalata, V. , 2012, Plant Phenolics: A Biochemical and Physiological Perspective, in *Recent Advances in Polyphenol Research*, Volume 3 (eds V. Cheynier, P. Sarni-Manchado and S. Quideau), Wiley-Blackwell, Oxford, UK, pp 1-27
- [8] Véronique Cheynier, Gilles Comte, Kevin M. Davies, Vincenzo Lattanzio, Stefan Martens, 2013 ,Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology, *Plant Physiology and Biochemistry*, Volume 72, pp 1-20
- [9] Wilfred Vermeris, Ralph Nicholson, 2008, *Phenolic Compound Biochemistry*, Springer Science & Business Media B.V., pp: 1-32
- [10] Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C. and Pouységu, L. , 2011, Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50, pp: 586-621
- [11] Yoshida, K., Oyama, K.-i. and Kondo, T. (2012) Chemistry of Flavonoids in Color Development, in *Recent Advances in Polyphenol Research*, Volume 3 (eds V. Cheynier, P. Sarni-Manchado and S. Quideau), Wiley-Blackwell, Oxford, UK
- [12] Erich Grotewold, 2006, *The Science of Flavonoids*, Springer Science & Business Media, Inc, UK, pp: 1-47
- [13] Nigel C. Veitch and Renée J. Grayer, 2011, Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins *Natural Product Reports* Issue 10 28, : pp 1626-1695
- [14] Jeremy P.E. Spencer, Alan Crozier, 2012, *Flavonoids and Related Compounds: Bioavailability and Function*, 2012, CRC Taylor & Francis Group, USA, pp: 1-39

- [15] Detsi, M. Majdalani, Kontogiorgis C.A., Hadjipavlou-Litina D., Kefalas P., 2009, Natural and synthetic 2'-hydroxy-chalcones and aurones: Synthesis, characterization and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17: pp 8073–8085
- [16] Francisco, M.L.D.L. and Resurreccion, A.V.A., 2008, Functional Components in Peanuts. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 715-746
- [17] Rensheng Xu, Weimin Zhao, Yang Ye, 2012, Introduction to Natural Products Chemistry, CRC Taylor & Francis Group, USA, pp 30-31, 81-121
- [18] Anne E. Osbourn, Virginia Lanzotti, 2009, Plant-derived Natural Products: Synthesis, Function, and Application, Springer Science & Business Media, LLC, USA. , pp: 3-51
- [19] Silvia R. Leicach, Hugo D. Chludil, 2014, Chapter 9 - Plant Secondary Metabolites: Structure–Activity Relationships in Human Health Prevention and Treatment of Common Diseases, *Studies in Natural Products Chemistry*, Volume 42, pp: 267-304
- [20] Jonathan Gorelick, Nirit Bernstein, 2014, Chapter Five - Elicitation: An Underutilized Tool in the Development of Medicinal Plants as a Source of Therapeutic Secondary Metabolites, In: Donald L. Sparks, Editor(s), *Advances in Agronomy*, Academic Press, 2014, Volume 124, pp: 201-230
- [21] Tsanko S. Gechev, Jacques Hille, Herman J. Woerdenbag, Maria Benina, Nikolay Mehterov, Valentina Toneva, Alisdair R. Fernie, Bernd Mueller-Roeber, 2014, Natural products from resurrection plants: Potential for medical applications, *Biotechnology Advances*, ISSN 0734-9750
- [22] Samiah Naji Alqahtani, Sarah Omar Alkholy and Maria Pontes Ferreira, 2014, Chapter 11 - Antidiabetic and Anticancer Potential of Native Medicinal Plants from Saudi Arabia, In *Polyphenols in Human Health and Disease*, edited by Ronald Ross Watson, Victor R. Preedy and Sherma Zibadi, Academic Press, San Diego, pp: 119-132
- [23] R. Ksouri, W. Megdiche-Ksouri, I. Jallali, A. Debez, C. Magné, I. Hiroko *et al.*, (2011), Medicinal halophytes: Potent source of health promoting biomolecules with medical, nutraceutical and food applications *Critical Reviews in Biotechnology*, pp: 1–38
- [24] A. Ghasemzadeh, N. Ghasemzadeh, 2011, Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (31) pp: 6697–6703
- [25] Hyo-Hyun Park, Soyoung Lee, Hee-Young Son, Seung-Bin Park, Mi-Sun Kim, Eun-Ju Choi, Thoudam S. K. Singh, Jeoung-Hee Ha, Maan-Gee Lee, Jung-Eun Kim, Myung Chul Hyun, Taeg Kyu Kwon, Yeo Hyang Kim, Sang-Hyun Kim, 2008, Flavonoids inhibit histamine release and expression of pro-inflammatory cytokines in mast cells *Archive of Pharmaceutical Research*, 31 pp: 1303–1311
- [26] Ean-Jeong Seo, Victor Kuete, Onat Kadioglu, Benjamin Krusche, Sven Schröder, Henry Johannes Greten, Joachim Arend, Ik-Soo Lee, and Thomas [27] Efferth, 2013, Antiangiogenic Activity and Pharmacogenomics of Medicinal Plants from Traditional Korean Medicine, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* , pp: 1-13

- [28] Loutrari H., Hatziapostolou M., Skouridou V., 2004, Perillyl alcohol is an angiogenesis inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther*, 311: 568-75
- [29] T. Kaneshiro, T. Morioka, M. Inamine et al., 2006 "Anthraquinone derivative emodin inhibits tumor-associated angiogenesis through inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation, *European Journal of Pharmacology*, vol. 553, no. 1-3, pp: 46-53
- [30] Lazarova, R. Gevrenova, 2013, *Asphodeline lutea*(L) RCHB.: A review of its botany phytochemistry and ethnopharmacology , *Journal of the Bulgarian Pharmaceutical scientific Society*, Vol. 60, No2, pp: 21-26
- [31] G. Todorova, I. Lazarova, B. Mikhova, and I. Kostova, 2010, Anthraquinone, naphthalene, and naphthquinone components of *Asphodeline lutea*, *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 46, No. 2, pp: 322-323
- [32] Laura Siracusa, Antonella Saija, Mariateresa Cristani, Francesco Cimino, Manuela D'Arrigo, Domenico Trombetta, Felice Rao, Giuseppe Ruberto, 2011, Phytocomplexes from liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) leaves – Chemical characterization and evaluation of their antioxidant, anti-genotoxic and anti-inflammatory activity, *Fitoterapia*, Vol 82, Issue 4, , pp: 546-556
- [33] Harwansh R. K., Patra K. C., Pareta S. K., Singh J., Biswas R., 2011, Pharmacological studies of *Glycyrrhiza glabra*: A Review : *Pharmacologyonline* 2 pp:1032-1038
- [34] Muhammad Parvaiz, Khalid Hussain, Saba Khalid, Nigam Hussain, Nukhba Iram, Zubair Hussain and Muhammad Azhar Ali , 2014, A Review: Medicinal Importance of *Glycyrrhiza glabra* L. (Fabaceae Family), *Global Journal of Pharmacology* 8 (1) pp: 08-13
- [34] Wayne C. Liao, Yu-Hsin Lin, Tsong-Min Chang, Wen-Ying Huang, 2012, Identification of two licorice species, *Glycyrrhiza uralensis* and *Glycyrrhiza glabra*, based on separation and identification of their bioactive components, *Food Chemistry*, pp: 2188-2193.
- [35] Yu Fu, Jun Chen, Yan-Jing Li, Yun-Feng Zheng, Ping Li, 2013, Antioxidant and anti-inflammatory activities of six flavonoids separated from licorice, *Food Chemistry*, Volume 141, Issue 2, 15, pp: 1063-1071
- [36] G. Gkinis, A. Michaelakis, G. Koliopoulos, E. Ioannou, O. Tzakou , V. Roussis, 2013, Evaluation of the repellent effects of *Nepeta parnassica* extract, essential oil, and its major nepetalactone metabolite against mosquitoes, *Parasitology Research* 113:3, 1127-1134
- [37] G.Gkinis, O.Tzakou, D. Iliopoulou, V.Roussis, 2003, Chemical composition and biological activity of *Nepeta parnassica* oils and isolated nepetalactones, pp: 681-6.
- [38] Halabalaki M, Alexi X, Aligiannis N, 2006, et al. Estrogenic activity of isoflavonoids from *Onobrychis ebenoides*. *Planta Med* ; 72(6), pp: 488-93
- [39] Mouna Ben Farhat, Ahmed Landoulsi, Rym Chaouch-Hamada, Jose A. Sotomayor, María J. Jordán, 2013, Profiling of essential oils and polyphenolics of *Salvia argentea* and evaluation of its by-products antioxidant activity, *Industrial Crops and Products*, Vol 47, pp: 106-112

- [40] A. Kabouche, Z. Kabouche (2008) Bioactives diterpenoids of *Salvia specia*. ur-Rahman (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry*, vol. 35, pp: 753–833
- [41] Mouna Ben Farhata, Ahmed Landoulsia, Rym Chaouch-Hamad, Jose A. Sotomayor, María J. Jordán, 2013, Characterization and quantification of phenolic compounds and antioxidant properties of *Salvia* species growing in different habitats, *Industrial Crops and Products* 49, pp: 904– 914
- [42] Καθαράκης Δημήτριος, 2006, *Flora Sporadum: Καταγραφή της Χλωρίδας των Βορείων Σποράδων και οι Μεταξύ τους Φυτογεωγραφικές Συνδέσεις*, Πάτρα.
- [43] Lavola, A., Karjalainen, R., Julkunen-Tiitto, R., 2012. Bioactive polyphenols in leaves, stems, and berries of Saskatoon (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, pp: 1020–1027
- [44] Ozga, J.A., Saeed, A., Wismer, W., Reinecke, D.M., 2007, Characterization of cyanidin- and quercetin-derived flavonoids and other phenolics in mature Saskatoon fruits (*Amelanchier alnifolia* Nutt.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, pp: 10414–10424
- [45] Mazza, G., Cottrell, T., 2008, Carotenoids and cyanogenic glucosides in saskatoon berries (*Amelanchier alnifolia* Nutt.). *Journal of Food Composition and Analysis* 21, pp: 249–254
- [46] Nisar Ullah, Saeed Ahmed, Pir Muhammad, Zaheer Ahmed, Ha_z Rab Nawaz, Abdul Malik, 1999, A lignan from *Daphne oleoides*, *Phytochemistry* 50, pp: 147-149
- [47] Nisar Ullah, Saeed Ahmed, Pir Muhammad, Zaheer Ahmed, Ha_z Rab Nawaz, Abdul Malik, 1999, Coumarin lignoid glycoside from *Daphne oleoides*, *Phytochemistry* 51 pp: 103-105
- [48] Erdem Yesilada, Hitomo Taninaka, Yoshihisa Takaishi, Gisho Hond, Ekrem Sezik, Hiroshi Momota, Yasukazu Ohmoto, Takao Taki, 2001, In vitro Inhibitory Effects of *Daphne Oleoides* Ssp. *Oleoides* on Inflammatory Cytokines and Activity- Guided Isolation of Active Constituents, *Cytokine*, Vol 13 No 5, pp: 359-364
- [49] Μαρκάκη Ελένη, “Εκτός Τόπου” Διατήρηση (Ex-situ) Των Ενδημικών Φυτών της Κρήτης, Ηράκλειο 2006
- [50] Gökbulut, A. Özhan, O. Satilmis, B. Batçioğlu, K., Günel, S. & Şarer, E. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities, and phenolic compounds of selected inula species from turkey. *Natural Product Communications*, 8(4), pp: 475-478.
- [51] Yong-Ming Zhao, Man-Li Zhang, Qing-Wen Shi, and Hiromasa Kiyota, 2006, Chemical Constituents of Plants from the Genus *Inula*, *CHEMISTRY & BIODIVERSITY* – Vol. 3 pp: 371-384
- [52] Lara Testai, Chericoni Silvio, Bader Ammar, Pistelli Luisa, Calderone Vincenzo, Enrica Martinotti, 2005, Vasorelaxant effects of the chloroformic crude extract of *Bupleurum fruticosum* L. (Umbelliferae) roots on rat thoracic aorta, *Journal of Ethnopharmacology*, Vol 96, Issues 1–2, pp: 93-97

- [53] Luisa Pistelli, Anna Rita Bilia, Alessandra Bertoli, Ivano Morelli and Antonio Marsili, 1995, Phenylpropanoids from *Bupleurum fruticosum*, *Journal of Natural Product Val.* 58, No. 1, pp: 112-116
- [54] Epameinondas Evergetis, Serkos A. Haroutounian, 2014, Exploitation of apiaceae family plants as valuable renewable source of essential oils containing crops for the production of fine chemicals, *Industrial Crops and Products* 54 pp: 70- 77
- [55] Višnja Popovic, Arne Heyericka, Silvana Petrovic, Serge Van Calenberghe, Izet Karalic, Marjan Niketic, Dieter Deforcea, 2013, Sesquiterpene lactones from the extracts of two Balkan endemic *Laserpitium* species and their cytotoxic activity, *Phytochemistry* 87, pp: 102-111
- [56] Cesidio Giuliani, Ines Bucci, Serena Di Santo, Cosmo Rossi, Antonino Grassadonia, Mauro Piantelli, Fabrizio Monaco, Giorgio Napolitano, 2014, The flavonoid quercetin inhibits thyroid-restricted genes expression and thyroid function, *Food and Chemical Toxicology*, Volume 66, pp: 23-29
- [57] Yon-Joo Mah, Je Seon Song, Seong-Oh Kim, Jae-Ho Lee, Mijeong Jeon, Ui-Won Jung, Seok Jun Moon, Jeong-Hee Kim, Hyung-Jun Choi, 2014, The effect of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on human alveolar bone cells both in vitro and in vivo, *Archives of Oral Biology*, Volume 59, Issue 5, pp: 539-549
- [58] Claudio Bucolo, Gian Marco Leggio, Filippo Drago, Salvatore Salomone, 2012, Eriodictyol prevents early retinal and plasma abnormalities in streptozotocin-induced diabetic rats, *Biochemical Pharmacology*, Volume 84, Issue 1, pp: 88-92
- [59] Linlin Zhen, Jiejun Zhu, Xin Zhao, Wu Huang, Yiran An, Shan Li, Xia Du, Mengmeng Lin, Qiandong Wang, Ying Xu, Jianchun Pan, 2012, The antidepressant-like effect of fisetin involves the serotonergic and noradrenergic system, *Behavioural Brain Research*, Volume 228, Issue 2, pp: 359-366
- [60] Yanyan Li, Tao Zhang, 2014, Targeting cancer stem cells by curcumin and clinical applications, *Cancer Letters*, Volume 346, Issue 2, pp: 197-205
- [61] Mitsuru Imamura, Oh Sasaki, Katsuhide Okunishi, Kazuyuki Nakagome, Hiroaki Harada, Kimito Kawahata, Ryoichi Tanaka, Kazuhiko Yamamoto, Makoto Dohi, 2014, Perillyl alcohol suppresses antigen-induced immune responses in the lung, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 443, Issue 1, pp: 266-271
- [62] David Hansi Priscilla, Debasish Roy, Aishwarya Suresh, Vinod Kumar, Kavitha Thirumurugan, 2014, Naringenin inhibits α -glucosidase activity: A promising strategy for the regulation of postprandial hyperglycemia in high fat diet fed streptozotocin induced diabetic rats, *Chemico-Biological Interactions*, Vol 210, Pages 77-85
- [63] Michael Potente, Holger Gerhardt, Peter Carmeliet, 2011, Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis, *Cell*, Volume 146, Issue 6, pp: 873-887
- [64] Thomas H Adair & Jean- Pierre Montani, 2011, *Angiogenesis*, Morgan & Claypool Life Sciences, pp: 1-6
- [65] David A. Cheresh, 2008, *Methods in Enzymology*, Angiogenesis: In Vitro Systems, Vol 443, Elsevier Inc, USA, pp: 66-138

- [66] Folkman J., 2007, Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery ? Nature 2007; 6 pp: 273-286
- [67] Napoleone Ferrara, 2007, Angiogenesis, From Basic Science to Clinical Applications, Taylor & Francis Group, USA, pp: 1-17
- [68] Adrian L. Harris and Daniele Generali, 2014, Chapter 10 - Inhibitors of Tumor Angiogenesis, In Cancer Drug Design and Discovery (Second Edition), edited by Stephen Neidle, Academic Press, San Diego, pp:275-317
- [69] Gurbir S. Bhatia, Michael D. Sosin, Jeetesh V. Patel, Karl A. Grindulis, Fazal H. Khattak, Russell C. Davis, Gregory Y.H. Lip, 2010, Plasma indices of angiogenesis in rheumatoid disease: Relationship to cardiovascular risk factors and cardiac function, International Journal of Cardiology, Volume 145, Issue 3, pp: e105-e108
- [70] Joseph F. Arboleda-Velasquez and Patricia A. D'Amore, 2014, Chapter 10 - Vasculogenesis and Angiogenesis, In Cellular and Molecular Pathobiology of Cardiovascular Disease, edited by Monte S. Willis, Jonathon W. Homeister and James R. Stone, Academic Press, San Diego, pp: 181-196
- [71] Patrycja Baranska, Hanna Jerczynka, Zofia Pawlowska, Wiktor Koziolkiewck and Czeslaw S. Cierniewski, 2005, Expression of Integrins and Adhesive Properties of Human Endothelial Cell Line EA.hy 926, Cancer Genomics & Proteomics 2 pp: 265-270
- [72] Hai-Bo SHI, Jian-Dong CHEN, Xiao-Hu CHEN, Yun HE, Zhi-Jian YANG, 2013, Effects of salvianolic acid and notoginseng triterpenes on angiogenesis in EA-hy926 cells in vitro, Chinese Journal of Natural Medicines, Vol 11, Issue 3, pp: 254-257
- [73] Oscar Bastidas, Cell Counting with Neubauer Chamber, Basic Hemocytometer Usage Neubauer Chamber Cell Counting, Technical Note.
- [74] Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 65, pp: 55-63.
- [75] DuoSet ELISA Development kit.
- [76] Technical Guide for ELISA, Protocols, Troubleshooting.

Ιστοσελίδες

- <http://www.botanical.com>
- <http://greekflora.gr>
- <http://floraolympus.blogspot.gr>
- <http://floraattica.blogspot.gr>
- <http://plants.jstor.org>
- <http://filotis.itia.ntua.gr>
- <http://www.pfaf.org>
- <http://apps.rhs.org>
- <http://hemocytometer.wordpress.com>
- <https://biotech-ntua.wikispaces.com/+ELISA+assay>