



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*Εθνοφαρμακολογική μελέτη φυτών της ελληνικής
χλωρίδας για τον εντοπισμό κυτταροτοξικών
φυσικών προϊόντων και αναστολέων των ενζύμων
ακετυλοχολινεστεράση, υαλουρονιδάση και
φωσφολιπάση*

ΑΘΗΝΑ, 2019
ΜΙΧΑΛΕΑ ΡΟΖΑΛΙΑ
ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΑΛΗΓΙΑΝΝΗΣ ΝΕΚΤΑΡΙΟΣ (Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ)

ΣΚΑΛΤΣΟΥΝΗΣ ΑΛΕΞΙΟΣ ΛΕΑΝΔΡΟΣ (Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ)

ΜΗΤΑΚΟΥ ΣΟΦΙΑ (Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ)

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΑΛΗΓΙΑΝΝΗΣ ΝΕΚΤΑΡΙΟΣ (Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ)

ΣΚΑΛΤΣΟΥΝΗΣ ΑΛΕΞΙΟΣ ΛΕΑΝΔΡΟΣ (Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ)

ΜΗΤΑΚΟΥ ΣΟΦΙΑ (Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ)

ΣΚΑΛΤΣΑ ΕΛΕΝΗ (Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ)

ΜΙΚΡΟΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ (Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ)

ΓΚΙΚΑΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ (Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ)

ΦΩΚΙΑΛΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ (Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω:

- Τα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Νεκτάριο Αληγιάννη, τον Καθηγητή κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη, την Καθηγήτρια κ. Σοφία Μητάκου, την Καθηγήτρια κ. Ελένη Σκαλτσά, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Νικόλαο Φωκιαλάκη, τον Καθηγητή κ. Εμμανουήλ Μικρό, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ευάγγελο Γκίκα που δέχτηκαν να κρίνουν την παρούσα διδακτορική διατριβή.
- Ιδιαίτερως θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Νεκτάριο Αληγιάννη, τον Καθηγητή κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη και την Καθηγήτρια κ. Σοφία Μητάκου για τη διαρκή παρακολούθηση και τις χρήσιμες συμβουλές τους.
- Τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Νεκτάριο Αληγιάννη και επιβλέπων της παρούσας διατριβής, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την εποπτεία του ερευνητικού έργου.
- Ιδιαίτερα ευχαριστώ το Δρ. Παναγιώτη Πολυχρονόπουλο για την άψογη συνεργασία μας, την καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια της παρούσας διδακτορικής διατριβής, τις επιστημονικές συμβουλές του, τη βοήθειά του, το ήθος του, την υπομονή και τη στήριξή του.
- Τη Φιλόλογο κ. Δεδούση Βασιλική για τη μετάφραση του κειμένου των *Θηριακών*, τη βοήθεια της, τις συμβουλές της και τη συνεχή παρουσία της κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διδακτορικής διατριβής.
- Τον Προϊστάμενο Ιστορικού και Παλαιογραφικού Αρχείου του Μορφωτικού Ιδρύματος της Εθνικής Τραπέζης κ. Αγαμέμωνα Τσελίκια για τα μεταφρασμένα χειρόγραφα κείμενα του Ιερόπαιδα και για τις χρήσιμες φιλολογικές παρεμβάσεις του.
- Το Φιλόλογο κ. Μιτουλάκη Δημήτριο για την απλόχερη βοήθειά του και τις συμβουλές του.
- Το Δρ. Καλπουτζάκη Ελευθέριο για τη σημαντική βοήθειά του στη συλλογή και αναγνώριση των φυτικών ειδών και τις πολύτιμες εθνοφαρμακολογικές συμβουλές του.
- Τη Δρ. Σταθοπούλου Γεωργία για τη λήψη των NMR φασμάτων και την HetCA επεξεργασία.
- Τη Δρ. Αγγελική Παναγιωτοπούλου για την απλόχερη βοήθειά της και τη λήψη των NMR φασμάτων στο ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος.

- Το Δρ. Παπαευσταθίου Γεώργιο για την σημαντική βοήθεια του στην υπερκρίσιμη εκχύλιση.
- Τη Δρ. Αντιγόνη Χείλαρη για τη λήψη των NMR φασμάτων.
- Τη Δρ. Μάρθα Κατσαρού για την πολύτιμη βοήθειά της σε θέματα βιολογικών πειραμάτων.
- Το Φαρμακοποιό κ. Φωτεινό Λυσσαίο για την παρουσία, την πολύτιμη συνεισφορά του στο εργαστήριο και τη βοήθειά του στη συλλογή των φυτικών ειδών και τη μελέτη του φυτού της αριστολόχιας.
- Τη Φαρμακοποιό κ. Μπόζνου Βασιλική για τη βοήθειά της, τη στήριξη και την άριστη συνεργασία μας καθ'όλη τη διάρκεια της παρούσας εργασίας.
- Όλους τους προπτυχιακούς, μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς φοιτητές του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα και τη συνεργασία.
- Τους φίλους μου για την απεριόριστη υπομονή και στήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, που με βοήθησε και με στήριξε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	Εθνοφαρμακολογία.....	1
2	Εθνοφαρμακολογικές πηγές	7
2.1	Η θεραπευτική στην Ελλάδα-Μια σύντομη ιστορική αναδρομή	7
2.2	Νίκανδρος ο Κολοφώνιος – Θηριακά.....	18
2.3	Πεδάνιος Διοσκουρίδης - Περί Ιατρικής Ύλης.....	31
2.4	Νικόλαος Ιερόπαις	36
3	Σχεδιασμός πειραματικής πορείας	38
4	Οι φυτικές δρόγες των <i>Θηριακών</i>	39
5	Οι φυτικές δρόγες του <i>Ιερόπαιδα</i>	52
6	Φαρμακολογικοί Στόχοι	61
6.1	Δηλητήριο ερπετών και άλλων ζωικών οργανισμών – Δράσεις - Τρόποι αντιμετώπισης 61	
6.1.1	Γενικά.....	61
6.1.2	Δηλητήριο οφιοειδών	61
6.1.3	Δηλητήριο σκορπιών, αραχνοειδών, εντόμων	67
6.2	Παραδοσιακές θεραπείες δηγμάτων ανά τον κόσμο	70
6.3	Ακετυλοχολινεστεράση	78
6.3.1	Γενικά.....	78
6.3.2	Αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης (AChEIs)	84
6.4	Υαλουρονιδάση	100
6.4.1	Γενικά.....	100
6.4.2	Αναστολείς της υαλουρονιδάσης.....	110
6.5	Φωσφολιπάση A ₂	116
6.5.1	Γενικά.....	116
6.5.2	Αναστολείς της φωσφολιπάσης A ₂	126
6.6	Καρκίνος	128

7	Υλικά-Μέθοδοι-Τεχνικές	138
7.1	Συμπύκνωση και ξήρανση δειγμάτων.....	138
7.2	Τεχνικές Εκχύλισης	138
7.3	Αναλυτική Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (Analytical TLC)	140
7.4	Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας Υψηλής Απόδοσης (HPTLC)	140
7.5	Υγρή χρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας (LC – HRMS).....	142
7.6	Φυγόκεντρος Χρωματογραφία Κατανομής (FCPC)	142
7.7	Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού (SEC)	149
7.8	Παρασκευαστική Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (Prep - TLC)	150
7.9	Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)	150
7.10	Χρωματομετρικές Μέθοδοι	151
7.10.1	Αξιολόγηση του χημικού φορτίου.....	151
7.10.2	Αξιολόγηση της βιολογικής δράσης.....	154
7.11	Μελέτη ετεροδιακύμανσης φασματοσκοπικών δεδομένων και βιοδραστικότητας (HetCA)	173
7.12	Διαλύτες-Αντιδραστήρια.....	175
7.13	Βιβλιογραφία.....	176
8	Συλλογή φυτικών ειδών	187
9	Παρασκευή εκχυλισμάτων - Έλεγχος Χημικού φορτίου - Βιολογική Αξιολόγηση	192
10	<i>Aristolochia hirta</i> (Aristolochiaceae)	215
10.1	Σκοπός	215
10.2	Θεωρητικό Μέρος	215
10.2.1	Αναφορές της δρόγης στα υπό μελέτη κείμενα	215
10.2.2	Δρογοβοτανική-Γεωγραφική εξάπλωση-Βιότοπος.....	216
10.2.3	Δρογοϊστορία-Δρογοετυμολογία	221
10.2.4	Δρογοχημεία.....	222
10.2.5	Δρογοφαρμακολογία	237
	Παραδοσιακές Χρήσεις - Εθνοφαρμακολογικές Μελέτες – Τοξικότητα	237

10.3	Πειραματικό Μέρος	240
10.3.1	Εκχυλίσεις και Έλεγχος χημικού φορτίου ολικών εκχυλισμάτων	240
10.3.2	Βιολογική αξιολόγηση ολικών εκχυλισμάτων.....	244
10.3.3	Κλασμάτωση εκχυλισμάτων με φυγόκεντρο χρωματογραφία κατανομής (FCPC) 246	
10.3.4	Έλεγχος χημικού φορτίου FCPC κλασμάτων με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας.....	253
10.3.5	Απομόνωση και ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών.....	255
10.3.6	Βιολογική αξιολόγηση ΑΗΡC και ΑΗΥC εκχυλισμάτων, FCPC κλασμάτων και ουσιών	273
10.3.7	Μελέτη ετεροδιακύμανσης φασματοσκοπικών δεδομένων και βιοδραστικότητας (HetCA) στο εκχύλισμα ΑΗΥC.....	275
10.4	Συμπεράσματα	279
10.5	Βιβλιογραφία.....	280
11	<i>Anchusa undulata</i> ssp. <i>hybrida</i> (Boraginaceae).....	284
11.1	Σκοπός	284
11.2	Θεωρητικό Μέρος	284
11.2.1	Αναφορές της δρόγης στα υπό μελέτη κείμενα	284
11.2.2	Δρογοβοτανική-Γεωγραφική εξάπλωση-Βιότοπος.....	285
11.2.3	Δρογοϊστορία-Δρογοετυμολογία	288
11.2.4	Δρογοχημεία.....	289
11.2.5	Δρογοφαρμακολογία	293
	Εθνοφαρμακολογικές-Παραδοσιακές Χρήσεις Χρήσεις.....	293
11.3	Πειραματικό Μέρος	294
11.3.1	Εκχυλίσεις και Έλεγχος χημικού φορτίου ολικών εκχυλισμάτων	294
11.3.2	Βιολογική αξιολόγηση ολικών εκχυλισμάτων.....	296
11.3.3	Κλασμάτωση μεθανολικού εκχυλίσματος ΑURB με φυγόκεντρο χρωματογραφία κατανομής (FCPC).....	298
11.3.4	Έλεγχος χημικού φορτίου FCPC κλασμάτων με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC).....	303
11.3.5	Βιολογική αξιολόγηση των FCPC κλασμάτων	304
11.3.6	Απομόνωση και ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών.....	305
11.3.7	Βιολογική αξιολόγηση καθαρών ουσιών	318

11.4	Συμπεράσματα.....	320
11.5	Βιβλιογραφία.....	320
12	<i>Teucrium divaricatum</i> ssp. <i>divaricatum</i> (Lamiaceae)	323
12.1	Σκοπός.....	323
12.2	Θεωρητικό Μέρος.....	323
12.2.1	Αναφορές της δρόγης στα υπό μελέτη κείμενα	323
12.2.2	Δρογοβοτανική-Γεωγραφική εξάπλωση-Βιότοπος.....	324
12.2.3	Δρογοϊστορία-Δρογοετυμολογία	327
12.2.4	Δρογοχημεία.....	328
12.2.5	Δρογοφαρμακολογία	333
	Εθνοφαρμακολογικές-Παραδοσιακές Χρήσεις Χρήσεις.....	333
12.3	Πειραματικό Μέρος	337
12.3.1	Εκχυλίσεις και Έλεγχος χημικού φορτίου ολικών εκχυλισμάτων.....	337
12.3.2	Βιολογική αξιολόγηση ολικών εκχυλισμάτων.....	339
12.3.3	Κλασμάτωση υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος TDYC με φυγόκεντρο χρωματογραφία κατανομής (FCPC)	340
12.3.4	Έλεγχος χημικού φορτίου FCPC κλασμάτων με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC).....	343
12.3.5	Βιολογική αξιολόγηση των FCPC κλασμάτων	344
12.3.6	Απομόνωση και ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών.....	345
12.3.7	Βιολογική αξιολόγηση καθαρών ουσιών	365
12.4	Συμπεράσματα.....	367
12.5	Βιβλιογραφία.....	367
13	<i>Adiantum capillus-veneris</i> (Pteridaceae)	372
13.1	Σκοπός.....	372
13.2	Θεωρητικό Μέρος.....	372
13.2.1	Αναφορές της δρόγης στα υπό μελέτη κείμενα	372
13.2.2	Δρογοβοτανική-Γεωγραφική εξάπλωση-Βιότοπος.....	373
13.2.3	Δρογοϊστορία-Δρογοετυμολογία	375
13.2.4	Δρογοχημεία.....	376
13.2.5	Δρογοφαρμακολογία	378

Εθνοφαρμακολογικές-Παραδοσιακές Χρήσεις Χρήσεις	378
13.3 Πειραματικό Μέρος	383
13.3.1 Εκχυλίσεις και Έλεγχος χημικού φορτίου ολικών εκχυλισμάτων	383
13.3.2 Βιολογική αξιολόγηση ολικών εκχυλισμάτων.....	384
13.3.3 Κλασμάτωση υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος ACWC με φυγόκεντρο χρωματογραφία κατανομής (FCPC)	385
13.3.4 Έλεγχος χημικού φορτίου FCPC κλασμάτων με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC)	388
13.3.5 Βιολογική αξιολόγηση των FCPC κλασμάτων	389
13.3.6 Απομόνωση και ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών.....	391
13.3.7 Βιολογική αξιολόγηση καθαρών ουσιών	405
13.4 Συμπεράσματα	405
13.5 Βιβλιογραφία.....	406
14 <i>Paeonia parnassica</i> (Paeoniaceae)	410
14.1 Σκοπός	410
14.2 Θεωρητικό Μέρος	410
14.2.1 Αναφορές της δρόγης στα υπό μελέτη κείμενα	410
14.2.2 Δρογοβοτανική-Γεωγραφική Εξάπλωση-Βιότοπος.....	411
14.2.3 Δρογοϊστορία-Δρογοετυμολογία	415
14.2.4 Δρογοχημεία.....	417
14.2.5 Δρογοφαρμακολογία	427
Παραδοσιακές Χρήσεις - Εθνοφαρμακολογικές Μελέτες	427
14.3 Πειραματικό Μέρος	436
14.3.1 Εκχυλίσεις και Έλεγχος χημικού φορτίου ολικών εκχυλισμάτων	436
14.3.2 Βιολογική αξιολόγηση ολικών εκχυλισμάτων.....	439
14.3.3 Κλασμάτωση υδατοαλκοολικών εκχυλισμάτων PPAC και PPRC με φυγόκεντρο χρωματογραφία κατανομής (FCPC)	441
14.3.4 Έλεγχος χημικού φορτίου FCPC κλασμάτων με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC)	452
14.3.5 Βιολογική αξιολόγηση των FCPC κλασμάτων	455
14.3.6 Ανάλυση φασμάτων ¹ H-NMR των FCPC κλασμάτων	460
14.3.7 Μελέτη ετεροδιακύμανσης φασματοσκοπικών δεδομένων και βιοδραστικότητας (HetCA)	464

14.3.8	Απομόνωση και ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών.....	480
14.3.9	Βιολογική αξιολόγηση καθαρών ουσιών	535
14.4	Συμπεράσματα	541
14.5	Βιβλιογραφία.....	542

ΣΥΝΤΟΜΟΦΡΑΦΙΕΣ

AD: Alzheimer's Disease	SFE: Supercritical Fluid Extraction
ACh: Acetylcholine	UAE : Ultrasound Assisted Extraction
AChE: Acetylcholinesterase	NMR: Nuclear Magnetic Resonance
AChEI: Acetylcholinesterase Inhibitor	HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation
Hyal: Hyaluronidase	HSQC-DEPT: Heteronuclear Single Quantum Coherence-Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
HA: Hyaluronic acid	COSY: Correlation Spectrometry
GAG: Γλυκοζαμινογλυκάνη	COSY-LR Long Range Correlation Spectrometry
ECM: ExtraCellular Matrix	d: Διπλή
sPLA2:Secretory Phospholipase A2	dd: Διπλή διπλών
FCPC: Φυγόκεντρος Χρωματογραφία Κατανομής	t: τριπλή
LC-MS: Υγρή Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας	m: πολλαπλή
TLC: Thin Layer Chromatography	¹ H: Πρωτόνιο
HPTLC: High Performance Thin Layer Chromatography	¹³ C: Άνθρακας
EtOAc:Οξικός αιθυλεστέρας	δ: Χημική μετατόπιση
DCM: Διχλωρομεθάνιο	MeOD: Δευτεριωμένη μεθανόλη
MeOH: Μεθανόλη	CDCl ₃ Δευτεριωμένο χλωροφόρμιο
EtOH: Αιθανόλη	C-Hex: Κυκλοεξάνιο
FA: Φορμικό οξύ	AA: Οξικό οξύ
NA-FBB:Naphyl Acetate-Fast Blue B	HetCA: Heterocovariance Approach

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η προσφορά των εθνοφαρμακολογικών μελετών στην ανακάλυψη νέων φαρμάκων είναι σημαντική, αδιαμφισβήτητη και πολυετής. Τα τελευταία χρόνια ολοένα και περισσότεροι είναι οι επιστήμονες που στρέφονται προς αυτό το διεπιστημονικό πεδίο έρευνας το οποίο παρότι είναι χρονοβόρο και παρουσιάζει ποικίλες δυσκολίες μπορεί να οδηγήσει σε σπουδαία ευρήματα όπως συναίβει στις περιπτώσεις του κουραρίου, της γαλανθαμίνης και της αρτεμισινίνης.

Αφετηρία της παρούσας εργασίας αποτέλεσαν δύο κείμενα Ελλήνων θεραπευτών - λόγιων οι οποίοι έζησαν σε διαφορετικές χρονικές περιόδους, Νίκανδρος ο Κολοφώνιος (2^{ος} αιώνας π.Χ.) και Νικόλαος Ιερόπαις (17^{ος} αιώνας μ.Χ.), και συνέταξαν δύο διαφορετικού τύπου και περιεχομένου έργα με κοινό όμως χαρακτηριστικό τη χρήση των βοτάνων για τη θεραπεία των ασθενειών που πραγματεύονται. Το έργο του πρώτου συγγραφέα, *Θηριακά*, είναι ένα ποίημα αποτελούμενο από 958 στίχους, γραμμένο σε ομηρίζουσα διάλεκτο και με αρκετά δυσνόητο περιεχόμενο, το οποίο μεταφράστηκε στη νέα ελληνική γλώσσα το 2014 οπότε και έγινε δυνατή η χρησιμοποίησή του ως εθνοφαρμακολογική πηγή. Αποτελεί ένα κείμενο όπου περιγράφονται διάφορα είδη ιοβόλων ερπετών και εντόμων, οι επιπτώσεις που προκαλούνται στον άνθρωπο όταν προσβληθεί από αυτά καθώς και μια πληθώρα βοτάνων, υπό τη μορφή συνταγών, που χορηγούνται είτε *per os* είτε τοπικά, ικανών να λειτουργήσουν ως αντίδοτα και θεραπείες αυτών των καταστάσεων. Το έργο του Ιερόπαιδα είναι ένα χειρόγραφο μεταβυζαντινής περιόδου στο οποίο περιγράφονται οι ασθένειες και οι αντίστοιχες συνταγές φυτοθεραπευτικής. Από αυτό καταγράφηκαν και αξιοποιήθηκαν μόνο οι πληροφορίες που αφορούσαν φυτικές δρόγες ενάντια υπερπλασιών. Και στις δύο περιπτώσεις, η εξαντλητική μελέτη των κειμένων οδήγησε στην καταγραφή 217 φυτικών ειδών, κάποια από τα οποία είναι κοινά, ενώ καταρτίστηκαν δύο λίστες με τα φυτικά είδη που περιγράφονται στα έργα αυτά με αντιοφικές και αντικαρκινικές ιδιότητες, αντίστοιχα. Για κάθε φυτικό είδος έγινε χρήση κατάλληλων εγχειριδίων, βιβλιογραφίας και λεξικών, προκειμένου να επιτευχθεί μια εύστοχη αντιστοίχιση του αναφερόμενου βοτάνου με τη σύγχρονη λατινική του ονομασία. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε επιλογή 31 φυτικών ειδών τα οποία συλλέχθηκαν κατά τα έτη 2015-2016.

Εν συνεχεία ορίστηκε η καταλληλότερη πειραματική πορεία η οποία θα μπορούσε να αποδείξει την αιτιολογική βάση των υπό μελέτη κειμένων και να οδηγήσει σε βιοδραστικά φυσικά προϊόντα. Οι φαρμακολογικοί στόχοι που πλαισίωσαν την συγκεκριμένη εθνοφαρμακολογική μελέτη είναι τρία διαφορετικά υδρολυτικά ένζυμα, η ακετυλοχολινεστεράση, η υαλουρονιδάση, η φωσφολιπάση τα οποία απαντώνται στο δηλητήριο των οφιοειδών και σχετίζονται με τα *Θηριακά* και τρεις καρκινικές κυτταρικές σειρές, στήθους (MCF-7), μελανώματος (A2058) και ηπατοκαρκινώματος (HepG2) και μια φυσιολογική σειρά ινοβλαστών CCD-25Sk, οι οποίες σχετίζονται με το κείμενο του Ιερόπαιδα. Τα συλλεχθέντα φυτικά είδη εκχυλίστηκαν με διαλύτες διαφορετικής πολικότητας, διχλωρομεθάνιο, αλκοόλη, αλκοόλη/νερό 50/50. Τα παραληφθέντα εκχυλίσματα μαζί με κάποια ακόμη που προϋπήρχαν στο εργαστήριο αποτέλεσαν μια 'εθνοφαρμακολογική' βιβλιοθήκη εκχυλισμάτων. Ο έλεγχος του χημικού φορτίου αυτών έγινε με Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας Υψηλής Απόδοσης (HPTLC) και με Υγρή Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας (LC - MS). Ακολούθησε ο *in vitro* βιολογικός έλεγχος των ολικών εκχυλισμάτων στους στόχους που αναφέρθηκαν παραπάνω. Επτά εκχυλίσματα επελέγησαν να αναλυθούν φυτοχημικά καθώς παρουσίασαν ενδιαφέρον τόσο ως προς το χημικό τους φορτίο όσο και ως προς τη δράση του επέδειξαν.

Το είδος *Aristolochia hirta* παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς αποτελεί ενδημικό είδος των νήσων Ανατολικού Αιγαίου και Μικράς Ασίας, δεν υπάρχει προηγούμενη μελέτη που να αφορά τη φυτοχημεία των ριζών και των υπέργειων τμημάτων και περιέχει δευτερογενείς μεταβολίτες που ανήκουν στην κατηγορία των αριστολοχικών οξέων. Επίσης το υδατομεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του είδους εμφάνισε ισχυρή ανασταλτική δράση ενάντια της AChE. Τα δύο υδατομεθανολικά εκχυλίσματα των ριζών (AHRC) και των υπέργειων τμημάτων (AHYC) του είδους *Aristolochia hirta* (Aristolochiaceae) κλασματώθηκαν με Φυγόκεντρο Χρωματογραφία Κατανομής (FCPC). Η επεξεργασία ορισμένων κλασμάτων του εκχυλίσματος των ριζών οδήγησε στο χρωματογραφικό διαχωρισμό και την απομόνωση των 7 κυριότερων δευτερογενών μεταβολιτών οι οποίοι ανήκουν στις κατηγορίες των αριστολοχικών όπως τα αριστολοχικό οξύ I, II και IV και των κουμαρικών οξέων όπως, 6-Ο-π-κουμαροϋλο-α-D-γλυκοκυρανόση και 6-Ο-π-κουμαροϋλο-β-D-γλυκοκυρανόση. Το εκχύλισμα AHRC και τα CPC κλάσματά του δεν εμφάνισαν αξιοσημείωτη βιολογική δράση στη δοκιμασία αναστολής της φωσφολιπάσης. Στην περίπτωση των κλασμάτων που προήλθαν από το υδατομεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του είδους έγινε αξιολόγηση της

ικανότητας αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης ενώ πραγματοποιήθηκε η λήψη των φασμάτων $^1\text{H} - \text{NMR}$. Ο υπεύθυνος για τη δράση μεταβολίτης απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε ως το καφεοϋλομαλικό οξύ ενώ υπολογίστηκε η μέση ανασταλτική συγκέντρωση του στη δοκιμασία αναστολής της AChE με τη μέθοδο NA-FBB. Μέσω της μεθόδου ετεροσυνδιακύμανσης (HetCA) ήταν δυνατή η επαλήθευση της υπεύθυνης, για την παρατηρούμενη ισχυρή δράση, ουσίας. Επίσης αναδείχθηκε η συμβολή στη δράση και των μεθυλεστέρων του *trans*-καφεοϋλομαλικού οξέος και του *trans*-κουμαροϋλομαλικού οξέος.

Το μεθανολικό εκχύλισμα των ριζών του είδους *Anchusa undulata ssp. hybrida* παρουσίασε ισχυρή αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης και ενδιαφέρον χημικό προφίλ. Κλασματώθηκε με Φυγόκεντρο Χρωματογραφία Κατανομής (FCPC) και τα παραληφθέντα κλάσματα αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητα αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης. Η ισχυρότερη δράση εντοπίστηκε σε συγκεκριμένα κλάσματα. Ακολούθησε η απομόνωση του υπεύθυνου βιοδραστικού προϊόντος το οποίο ταυτοποιήθηκε ως η πρενυλοϋδροκινόνη, η οποία απομονώθηκε πρώτη φορά από το γένος *Anchusa*. Η ουσία παρουσίασε ισχυρή δράση έναντι της AChE και με τις δύο μεθόδους αξιολόγησης. Επίσης απομονώθηκαν άλλες πέντε ουσίες όπως το ροσμαρινικό οξύ και αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητα αναστολής της υαλουρονιδάσης και ακετυλοχολινεστεράσης. Το ροσμαρινικό οξύ εμφάνισε σημαντική δράση στη δοκιμασία αναστολής της AChE με τη μέθοδο NA-FBB και στη δοκιμασία αναστολής της υαλουρονιδάσης.

Το υδατομεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του είδους *Teucrium divaricatum ssp. divaricatum* παρουσίασε αξιοσημείωτη κυττατοτοξική δράση έναντι των MCF-7 κυττάρων και ανασταλτική της ακετυλοχολινεστεράσης δράση με τη μέθοδο NA-FBB. Επίσης εμφάνισε ενδιαφέρον χημικό φορτίο. Για τους λόγους αυτούς πραγματοποιήθηκε η κλασμάτωση του με Φυγόκεντρο Χρωματογραφία Κατανομής (FCPC). Τα κλάσματα αυτού αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητα αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης και υαλουρονιδάσης. Μέσω χρωματογραφικών τεχνικών έγινε δυνατή η απομόνωση δέκα δευτερογενών μεταβολιτών οι οποίοι ανήκουν στις κατηγορίες των φαινολικών όπως το χλωρογενικό οξύ, των φαινυλοπροπανοειδών όπως ο τεουκραιοσίδης αλλά και των γλυκοζυλιωμένων φλαβονοειδών όπως η ισοκερκετίνη. Επίσης παραλήφθηκε το ιριδοειδές 8-O-(3,4-διμεθοξυκιναμούλο)μυσοποροσίδης, για τον οποίο δεν υπάρχει προηγούμενη αναφορά. Στον έλεγχο της βιολογικής δράσης, ισχυρή αναστολή της AChE με τη μέθοδο NA-FBB προκάλεσαν τα φαινυλοπροπανοειδή, με ισχυρότερη τη δράση του τεουκραιοσίδη.

Το υδατομεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του είδους *Adiantum capillus-veneris* παρουσίασε μέτρια δράση στις δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας (μόνο το άπολο εκχύλισμα ήταν δραστικό έναντι των MCF-7 κυττάρων) και αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης και υαλουρονιδάσης. Ωστόσο οι εθνοφαρμακολογικές αναφορές και το χημικό του προφίλ αποτέλεσαν τις βασικότερες αιτίες για την περαιτέρω φυτοχημική του ανάλυση. Το εκχύλισμα κλασματώθηκε με Φυγόκεντρο Χρωματογραφία Κατανομής (FCPC) και τα κλάσματά του αξιολογήθηκαν ως πιθανοί αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης και υαλουρονιδάσης. Ακολούθησε η απομόνωση έξι δευτερογενών μεταβολιτών με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού. Οι καθαρές ουσίες δοκιμάστηκαν στα ένζυμα – στόχους όπου μόνο τα μίγματα των υδρολυόμενων ταννινών εμφάνισαν σημαντική δράση ενάντια στην AChE, και με τις δύο μεθόδους αξιολόγησης.

Τα δύο υδατομεθανολικά εκχυλίσματα των ριζών και των υπέργειων τμημάτων του ελληνικού ενδημικού είδους *Raeonia rarnassica* (Raeoniaceae) παρουσίασαν σημαντική κυτταροτοξική δράση και αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης και υαλουρονιδάσης. Η έλλειψη προηγούμενων αναφορών για τους δευτερογενείς μεταβολίτες των υπέργειων τμημάτων τους είδους και η ύπαρξη μόνο δύο για τις ρίζες αποτέλεσαν επιπλέον λόγους επιλογής του είδους προς περαιτέρω μελέτη. Τα εκχυλίσματα αυτά κλασματώθηκαν με Φυγόκεντρο Χρωματογραφία Κατανομής (FCPC). Ακολούθησαν η βιολογική αξιολόγηση των κλασμάτων ενάντια των υδρολυτικών ενζύμων και η παραλαβή των φασμάτων ^1H - NMR. Για τον εντοπισμό των υπεύθυνων βιοδραστικών φυσικών προϊόντων στα κλάσματα, πριν πραγματοποιηθεί η απομόνωσή τους, εφαρμόστηκε μια πρόσφατα ανεπτυγμένη μέθοδος ετεροσυνδιακύμανσης (Heterocovariance, HetCA) η οποία επιτρέπει το συσχετισμό δεδομένων NMR και βιολογικής δραστικότητας. Μέσω της μεθόδου HetCA έγινε δυνατή η ανίχνευση των ουσιών που προέρχονταν από το υδατομεθανολικό εκχύλισμα είτε των ριζών είτε των υπέργειων τμημάτων και οι οποίες συνεισέφεραν περισσότερο στις παρατηρούμενες δράσεις. Εν συνεχεία, προκειμένου να διαπιστωθεί η ακρίβεια των αποτελεσμάτων HetCA για τους δευτερογενείς μεταβολίτες που συνεισφέρουν ή όχι στη δράση, ακολούθησε στοχευμένη απομόνωση των ουσιών από τα κλάσματα που ανιχνεύθηκαν και αξιολόγηση της δραστικότητάς τους. Έτσι έγινε δυνατή η παραλαβή 13 ουσιών (παιωνιφλοριγενόνη, γαλλικός μεθυλεστέρας, παιωνιλακτόνη Β, παιωνιφλορίνη, οξυπαιωνιφλορίνη, αλμπιφλορίνη,) από το εκχύλισμα των ριζών και 19 ουσιών (4 κοινές ουσίες) από το εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων και η ταυτοποίησή τους πραγματοποιήθηκε με πειράματα NMR. Μέσω της βιολογικής αξιολόγησης αυτών αναδείχθηκε

η ουσία 1,2,3,4,6 – πενταγαλλικός εστέρας της γλυκόζης ως ο πιο δραστικός μεταβολίτης ενώ ουσίες όπως το γαλλικό οξύ ως μέτριας δραστικότητας έναντι των ενζυμικών στόχων.

Συμπερασματικά, δύο κείμενα θεραπευτικής μελετήθηκαν και από αυτά δημιουργήθηκαν λίστες των αναφερόμενων φυτικών ειδών. Πραγματοποιήθηκε η συλλογή ορισμένων από αυτά και η εκχύλιση τους με διαλύτες διαφορετικών πολικιοτήτων. Επτά εκχυλίσματα αξιολογήθηκαν περαιτέρω και επεξεργάστηκαν φυτοχημικά και φαρμακολογικά. Εν συνεχεία κλασματώθηκαν και από αυτά απομονώθηκαν 58 ουσίες, μετά από κατεργασία. Οι ουσίες ανήκουν σε ποικίλες χημικές κατηγορίες, όπως ιριδοειδή, μονοτερπένια, φαινολικά, φλαβονοειδή, αριστολοχικά οξέα κ.ά. Η ποικιλία των δευτερογενών μεταβολιτών ήταν εξ' αρχής στόχος της παρούσας μελέτης. Οι ουσίες αξιολογήθηκαν φαρμακολογικά στις δοκιμασίες αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης και υαλουρονιδάσης. Κάποιες από αυτές ήταν πολύ δραστικές στον πρώτο ενζυμικό στόχο π.χ. τεουκριοσίδης, πρενυλοϋδροκινόνη και άλλες στο δεύτερο ενζυμικό στόχο π.χ. ροσμαρινικό οξύ. Η παραλαβή δραστικών μεταβολιτών θα μπορούσε να υποστηρίξει την εθνοφαρμακολογική χρήση των φυτικών ειδών από τα οποία προήλθαν. Τέλος σημαντικό είναι ότι χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό εργαλείο HetCA, το οποίο επιτρέπει τη συσχέτιση βιολογικής δράσης και φασματοσκοπικών δεδομένων, ως ένας νέος, πιο σύντομος, τρόπος διαχείρισης και αξιολόγησης του μεγάλου όγκου των εθνοφαρμακολογικών δεδομένων.

ABSTRACT

The contribution of the ethnopharmacological studies in the discovery of new drugs is really important, undoubted and is occurring over decades. More and more researchers show a great interest in that interdisciplinary field throughout the last years. Although the tracing of new bioactive compounds through ethnopharmacology is time-consuming and includes lots of steps and various difficulties, it can really lead to important findings such as the cases of curare, galanthamine and artemisinin.

The beginning of this research was the study of two texts belonging to two Greek physicians – grammarians who lived during different chronological periods, Nicander of Colophon (2nd century BC) and Nikolaos Ieropais (17th century), and wrote two works of different type and content but both referred to the use of herbs as treatments for the reported ailments. The work of the first writer, *Theriaca*, is a poem consisting of 958 lyrics written in an ancient idiomatic dialect and thus difficult to translate. The translation of this was accomplished in 2014 so it became easy to use as a source of therapeutic plants. The text describes several species of venomous invertebrates (e.g. venomous snakes, spiders and scorpions) and insects, the damages caused on humans from their bites and several herbs used as remedies, fumigations, ointments and antidotes. The work of the second writer, Ieropais, is a Post-Byzantine manuscript, describing various illnesses and their phytotherapeutic treatments. From this source, only the information and the herbs related to several types of hyperplasia were recorded and evaluated. In both occasions, the exhaustive study of the texts led to the interpretation of 217 medicinal plants according to literature and late byzantine glossaries and two lists of the reported plant species with anticancer and anti-venom properties, respectively, were developed. The two lists had a number of species in common. The use of the suitable glossaries permitted the correspondence of these herbs with their contemporary latin names. Moreover there was made a selection of 31 plant species which were collected during the years 2015-2016.

Furthermore the most appropriate experimental procedure was designed in order to reveal the accuracy of the two scripts and lead to bioactive secondary metabolites. The pharmacological targets of this ethnopharmacological research were on the one hand three different types of hydrolytic enzymes, acetylcholinesterase, hyaluronidase and phospholipase

which are involved in snake envenomation as they induce the local effect and help the spreading of the toxins into the system and are related to *Theriaca*, and on the other hand three cancer cell lines, breast adenocarcinoma (MCF-7), melanoma (A2058), hepatocellular carcinoma (HepG2) and a normal cell line, CCD-25Sk, of fibroblasts which are related to the text of Ieropais. The collected plant species were extracted with solvents of different polarities i.e. dichloromethane, alcohol and alcohol/water 50/50. The obtained extracts along with some others from our in-house library constituted a new 'ethnopharmacological' library of extracts. Their chemical profiling was accomplished through High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) and Liquid Chromatography – Mass Spectrometry (LC - MS). The *in vitro* biological evaluation of the crude extracts in the aforementioned targets was the next step. Seven extracts were selected for further phytochemical analysis because of their interesting chemical content, their endemism and their significant biological activities (inhibitory capacities).

Aristolochia hirta exhibits a great interest since it is an endemic species of the region of East Aegean islands and Turkey, there is no previous phytochemical study and contains metabolites which belong to the category of aristolochic acid. Also the hydroalcoholic extract of the aerial parts showed strong inhibition of AChE. The two hydroalcoholic extracts from the roots (AHRC) and aerial parts (AHYC) of the species *Aristolochia hirta* (Aristolochiaceae) were fractionated by means of FCPC. Seven major compounds were isolated from the obtained fractions of the root's extract. They belong to aristolochic acids and coumaroyl-derivatives. The initial extract (AHRC) and its fractions did not exhibit noteworthy inhibition of phospholipase. In the case of the fractions of the aerial part's extract (AHYC), the HetCA technique was performed, after their biological evaluation regarding their ability of acetylcholinesterase inhibition and the recording of their ¹H – NMR spectra. As a result HetCA designated caffeoylmalic acid as the most potent acetylcholinesterase inhibitor. Caffeoylmalic acid was isolated, identified and exhibited strong inhibition of AChE. Its methylester derivatives and the methylesters of coumaroylmalic acid were shown to attribute also in the initial inhibitory activity, through the HetCA approach.

The methanolic extract of the roots of the species of *Anchusa undulata* ssp. *hybrida* (Boraginaceae) showed strong acetylcholinesterase inhibition and interesting chemical profile. Its FCPC fractionation was performed and the obtained fractions were evaluated for their acetylcholinesterase inhibitory capacity. The fractions which exhibited the strongest inhibitions were revealed and the responsible bioactive compound was isolated and identified as

prenylhydroquinone, which was isolated for the first time in genus *Anchusa*. This compound strongly inhibited AChE in both methods of AChE inhibition assays. Moreover five other compounds were received such as rosmarinic acid and evaluated for their inhibitory activities. Rosmarinic acid exhibited strong AChE inhibition through NA-FBB assay and hyaluronidase inhibition.

The hydroalcoholic extract of the aerial parts of the species *Teucrium divaricatum* ssp. *divaricatum* (Lamiaceae) exhibited important cytotoxic activity against MCF-7 cell line and acetylcholinesterase inhibitory activity, with the method of NA-FBB. Its chemical content was also interesting. Its fractionation was performed through FCPC. The biological assessment regarding the acetylcholinesterase and hyaluronidase inhibition for all the obtained fractions was performed. Ten major compounds were isolated after chromatographic separations. These compounds belong to several chemical categories such as phenolics (e.g. chlorogenic acid), phenylpropanoids (e.g. teucrioside) and glucosylated flavonoids (e.g. isoquercetin). The iridoid 8-*O*-(3,4-dimethoxycinnamoyl)myoporoside was isolated for the first time. The phenylpropanoids exhibited the highest percentages of AChE inhibition (NA-FBB assay). Teucrioside was the strongest inhibitor.

The hydroalcoholic extract of the aerial parts of *Adiantum capillus-veneris* (Pteridaceae) showed moderate cytotoxic and anti-acetylcholinesterase, anti-hyaluronidase activities while its chemical profile was the main reason of its selection for further phytochemical analysis. The crude extract was fractionated through FCPC and the obtained fractions were evaluated as possible acetylcholinesterase and hyaluronidase inhibitors. Six secondary metabolites, which mainly belong to the chemical categories of chlorogenic acids and flavonoid glucuronides were isolated. Only some mixtures of the obtained hydrolysable tannins showed noticeable anti-AChE activity.

The two hydroalcoholic extracts obtained from the roots and aerial parts of the the greek endemic species *Paeonia parnassica* (Paeoniaceae) exhibited important cytotoxic activities and abilities to inhibit acetylcholinesterase and hyaluronidase. It is important to mention that there was no other research for the secondary metabolites of the aerial parts while there were only two previous reports for the roots. These extracts were fractionated through Centrifugal Partition Chromatography (FCPC). The biological evaluation of the obtained fractions regarding their hydrolases inhibitory capacities was followed. Also their ¹H – NMR spectra were recorded. A

recently developed bioactivity-guided-NMR dereplication method, HeteroCovariance Approach (HetCA), which permits the correlation of NMR and biological data, was performed in order to detect the responsible bioactive compounds of the fractions, prior to any isolation. The revelation of the compounds from the roots and aerial parts extracts which mostly contributed to the observed inhibitory activities was feasible thanks to HetCA. Afterwards a number of targeted purifications of secondary metabolites and their consequent measurements of bioactivity took place so that we could find out the accuracy of the HetCA results. Thirteen compounds from the roots extract (paeoniflorigenone, methyl gallate, paeonilactone B, paeoniflorin, oxypaeoniflorin, albiflorin) and nineteen compounds from the aerial parts extract (4 compounds in common) were received and their chemical structures were identified by means of NMR. The biological evaluation of the secondary metabolites showed that 1,2,3,4,6-pentagalloyl-glucose was the most potent inhibitor while components like gallic acid were moderate inhibitors.

To summarize two medicinal texts were studied and their respective lists of the reported plant species were created. Some of the plants were collected and extracted with different solvents. Seven crude extracts were assessed phytochemically and biologically. They were fractionated and 58 secondary metabolites were obtained. The compounds belong to several chemical categories like iridoids, phenolics, flavonoids, phenylpropanoids, aristolochic acids etc. The diversity of the obtained compounds was initially a target of this research. Then the metabolites were tested as acetylcholinesterase and hyaluronidase inhibitors. Some of them like prenylhydroquinone, teucrioside were strong AChE inhibitors and others were strong hyaluronidase inhibitors like rosmarinic acid. In the end it was possible to rationalize the use of the initial herbs as antidotes and anticancer therapies and introduce the exploitation of them for the handling of contemporary diseases. Finally it was important that the statistical tool HetCA was used for the study of three of the extracts in order to examine if it can consist a new, quicker, scientific approach and assessment of the ethnopharmacological data.

ΣΚΟΠΟΣ

Στόχο της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε η εύρεση νέων κυτταροτοξικών παραγόντων και αναστολέων ακετυλοχολινεστεράσης, υαλουρονιδάσης και φωσφολιπάσης μέσω της εθνοφαρμακολογικής μελέτης δύο κειμένων που περιλαμβάνουν παραδοσιακές φυτοθεραπευτικές συνταγές. Το πρώτο είναι τα Θηριακά του Νικάνδρου. Πρόκειται για ένα αρχαίο ποίημα γραμμένο σε δυσνόητη ομηρίζουσα γλώσσα, το οποίο μεταφράστηκε στη νέα ελληνική το 2014, και σε αυτό περιγράφεται η χρήση φυτικών δρογών έναντι δηγμάτων ιοβόλων ζώων. Το δεύτερο κείμενο είναι ένα χειρόγραφο μεταβυζαντινής περιόδου, γραμμένο από έμπειρο γιατρό της εποχής, τον Ιερόπαιδα. Από τις συνταγές που αναφέρονται στο συγκεκριμένο έργο, αξιοποιήθηκαν μόνον όσες αφορούν στην αντιμετώπιση υπερπλασιών. Επίσης σημείο αναφοράς αποτέλεσε το έργο Περί Ιατρικής Ύλης του Διοσκουρίδη με το οποίο έγινε σύγκριση και επαλήθευση των καταγεγραμμένων αναφορών. Μέσω της λεπτομερούς και προσεκτικής μελέτης των δύο κειμένων δημιουργήθηκαν δύο λίστες των αναφερόμενων φυτικών δρογών. Εν συνεχεία φυτά της ελληνικής χλωρίδας συλλέχθηκαν και εκχυλίστηκαν με τεχνικές όπως η εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους (UAE), με χρήση διαλυτών διαφορετικών πολικοτήτων. Το χημικό φορτίο και η βιολογική δράση (κυτταροτοξικότητα, ικανότητα αναστολής ακετυλοχολινεστεράσης, υαλουρονιδάσης και φωσφολιπάσης) των εκχυλισμάτων αξιολογήθηκαν και από αυτά επιλέχθηκαν τα πιο ενδιαφέροντα προς περαιτέρω φυτοχημική μελέτη.

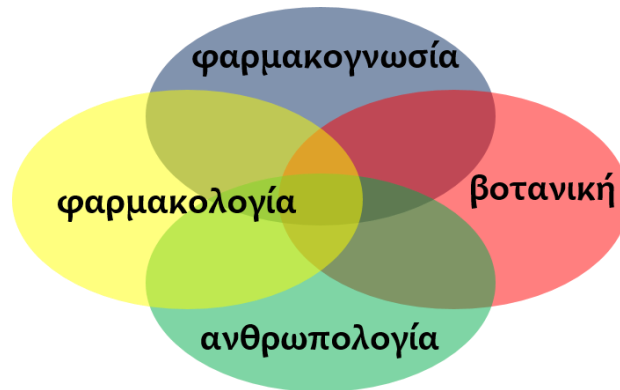
Τα πολικά εκχυλίσματα των ριζών και των υπέργειων τμημάτων της *Paeonia parnassica*, των ριζών και των υπέργειων τμημάτων της *Aristolochia hirta*, των υπέργειων τμημάτων του *Teucrium divaricatum* ssp. *divaricatum*, *Adiantum capillus-veneris* και των ριζών της *Anchusa undulata* ssp. *hybrida* μελετήθηκαν φυτοχημικά (με κλασική φυτοχημεία ή με πιο σύγχρονες τεχνικές όπως το στατιστικό μοντέλο HetCA) και φαρμακολογικά. Τα συγκεκριμένα φυτά αναφέρονται τόσο από το Νίκανδρο όσο και από τον Ιερόπαιδα και απαντώνται συχνά στην παραδοσική θεραπευτική διαφόρων λαών. Μέσω της παρούσας διατριβής έγινε η προσπάθεια συστηματικής εθνοφαρμακολογικής μελέτης δύο κειμένων θεραπευτικής ώστε να αξιολογηθεί και να αξιοποιηθεί η καταγεγραμμένη πληροφορία. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές πειραματικές προσεγγίσεις προκειμένου να διαπιστωθεί ποια από αυτές μπορεί

να εξυπηρετήσει καλύτερα τους σκοπούς της εθνοφαρμακολογίας όσον αφορά το χρόνο και την ακρίβεια των αποτελεσμάτων.

1 Εθνοφαρμακολογία

Η εθνοφαρμακολογία αποτελεί ένα εξειδικευμένο ερευνητικό πεδίο και έχει μια σχετικά μικρή ιστορία. Ο όρος χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά το 1967 ως ο τίτλος βιβλίου που αφορούσε παραισθησιογόνα : *Εθνοφαρμακολογική Αναζήτηση Ψυχοτρόπων Φαρμάκων (Ethnopharmacologic Search for Psychoactive Drugs, Efron et al. (1970))*¹. Ωστόσο η χρήση της παραδοσιακής ιατρικής και των θεραπευτικών μεθόδων αυτόχθονων λαών αποτελεί μια ακόμη πιο παλιά στρατηγική ανακάλυψης και ανάπτυξης νέων φαρμάκων προερχόμενων από τη φύση. Παρόλο που σε κάποιες περιπτώσεις υπάρχει άμεση συσχέτιση ανάμεσα στην τοπική χρήση και στην σύγχρονη θεραπευτική ένδειξη ουσιών, υπάρχουν άλλες περιπτώσεις που αυτή η συσχέτιση είναι περίπλοκη και δύσκολη να διεξαχθεί. Ως εθνοφαρμακολογία ορίζεται η διεπιστημονική εξερεύνηση βιολογικά δραστικών παραγόντων τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά ή έχουν παρατηρηθεί από τον άνθρωπο². Το πρώτο συνθετικό του όρου, εθνο-, υποδηλώνει την ύπαρξη ενός πολιτισμού, μιας ομάδας ατόμων ενώ το δεύτερο συνθετικό, -φαρμακολογία, υποδηλώνει τις πηγές και τις χρήσεις των φαρμάκων τους. Προκειμένου να γίνουν δυνατές η παρατήρηση, η ταυτοποίηση, η περιγραφή και η πειραματική διερεύνηση συστατικών, επιδράσεων συστατικών, επιδράσεων φαρμάκων αυτόχθονων λαών απαιτείται η συνεργασία διαφόρων επιστημονικών κλάδων όπως η βοτανική, η φαρμακολογία, η τοξικολογία, η χημεία αλλά και οι ανθρωπιστικές επιστήμες. Η συνεργασία αυτών των κλάδων καθιστά δυνατή την κατανόηση μιας τοπικής γνώσης η οποία προκύπτει και στηρίζεται από τις σχέσεις μεταξύ των ανθρώπων της κοινωνίας, τις ιδεολογίες τους, το σκεπτικό χρήσης των πρώτων υλών τους, είτε πρόκειται για φυτικά είτε για άλλα είδη, καθώς επίσης και το φυσικό περιβάλλον. Σημείο κλειδί μιας εθνοφαρμακολογικής μελέτης αποτελεί η επεξήγηση της αιτιολογίας, της αναγνώρισης των συμπτωμάτων, της πρόγνωσης και της έννοιας μιας μεμονωμένης ασθένειας ή κατηγορίας ασθενειών. Όλα τα παραπάνω συμβάλλουν στην κατανόηση του γιατί οι άνθρωποι μιας κοινωνίας χρησιμοποιούν κάποια φάρμακα και πώς αυτοί κρίνουν την αποτελεσματικότητά τους, καθώς όπως η ασθένεια έτσι και η θεραπεία δεν είναι ένα γεγονός αλλά μια διαδικασία. Η εθνοφαρμακολογία, ως όρος, εμπεριέχει αυτές τις έννοιες και τα στοιχεία, ώστε να γίνει δυνατή η μελέτη των θεραπευτικών συστημάτων τοπικών κοινωνιών³. Η διάσωση και καταγραφή της πολιτισμικής κληρονομιάς λαών λίγο πριν αυτή χαθεί, και η επακόλουθη αξιολόγηση των παραγόντων που χρησιμοποιούνται αποτελούν τους αντικειμενικούς σκοπούς της εθνοφαρμακολογίας. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι λίγο μετά τις αρχές του 20^{ου} αιώνα

καθιερώθηκε και ο όρος εθνοβοτανική από τον Αμερικανό βοτανολόγο William Harshberger. Η εθνοβοτανική έχει μια πιο ευρεία έννοια, καθώς ως αντικείμενο μελέτης περιλαμβάνει όχι μόνο φαρμακευτικά φυτά αλλά και φυσικά προϊόντα που χρησιμοποιούνται ως τρόφιμα, χρωστικές, δηλητήρια, λιπάσματα και καλλωπιστικά. Κύριο όμως πεδίο μελέτης της εθνοβοτανικής αποτέλεσε η παραδοσιακή θεραπευτική και γι αυτό έχει προσφέρει πολύ στη θεωρητική ανάπτυξη της εθνοφαρμακολογίας.



Εικόνα 1. Επιστημονικοί κλάδοι εθνοφαρμακολογίας



Εικόνα 2. Το κουράριο

Ο Claude Bernard (1813-1878) διεξήγαγε λεπτομερείς μελέτες σχετικά με τις φαρμακολογικές επιδράσεις του κουραρίου, τονίζοντας τη σημασία της ανάλυσης της πληροφορίας που προέρχεται από την παραδοσιακή ιατρική με τη βοήθεια πειραματικών μεθόδων. Ο ίδιος θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ένας από τους πρώτους ερευνητές στον τομέα της εθνοφαρμακολογίας. Όπως είναι γνωστό, το κουράριο χρησιμοποιούνταν από συγκεκριμένες φυλές της Νότιας Αμερικής ως δηλητήριο στα βέλη τους. Επίσης έγινε γνωστός και ο τρόπος κατά τον οποίο οι πληθυσμοί αυτοί προετοίμαζαν τα δηλητήρια. Ο Γερμανός επιστήμονας Alexander von Humboldt (1800) συνάντησε μια ομάδα ιθαγενών οι οποίοι πανηγύριζαν την επιστροφή τους από τη συλλογή του απαραίτητου συστατικού του δηλητηρίου, το οποίο ήταν οι καρποί του φυτού *Bertholletia excelsa*. Ο A. von Humboldt επισήμανε τη μεγάλη δυσκολία ταυτοποίησης του δέντρου από το οποίο οι ιθαγενείς λάμβαναν την πρώτη ύλη τους. Η δυσκολία αυτή αποτελεί ένα από τα κλασικά προβλήματα κατά τη διεξαγωγή μιας εθνοφαρμακολογικής μελέτης. Στις δεκαετίες που ακολούθησαν, αποδείχθηκε ότι η βοτανική προέλευση του κουραρίου ήταν το

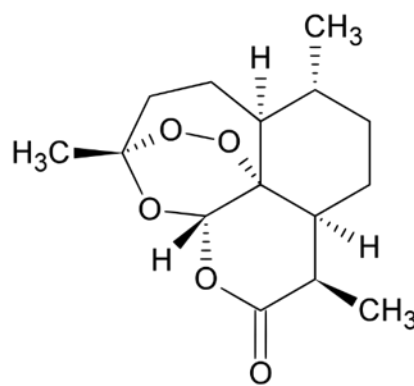
είδος *Chondrodendron tomentosum* Ruiz et Pavon το οποίο παράγει το συστατικό τουβοκουραρίνη. Αργότερα βρέθηκε ότι και άλλα είδη της οικογένειας Menispermaceae αλλά και της οικογένειας Loganiaceae (*Strychnos* spp.) χρησιμοποιούνταν για την παραγωγή κουραρίου. Η βιοεπιστημονική μελέτη αυτού του δηλητηρίου αποτέλεσε ένα από τα σημαντικότερα παραδείγματα μετατροπής ενός φαρμάκου που χρησιμοποιείται από μια αυτόχθονη κοινωνία σε μια σύγχρονη θεραπεία και ένα ερευνητικό εργαλείο της βιοϊατρικής. Οι φυσιολογικές και φαρμακολογικές επιδράσεις μελετήθηκαν συστηματικά από τον Claude Bernard, ο οποίος διαπίστωσε ότι ο θάνατος από το κουράριο προερχόταν από τη μυϊκή παράλυση του θύματος. Το υπεύθυνο συστατικό για τη δράση απομονώθηκε πρώτη φορά από το είδος *Chondrodendron tomentosum* ενώ το 1947 ταυτοποιήθηκε η δομή του bis-βενζυλοισοκινολο-αλκαλοειδούς D-τουβοκουραρίνη. Σήμερα, η ουσία αυτή χρησιμοποιείται σποραδικά σε κάποιες Ευρωπαϊκές χώρες, όπως για παράδειγμα στη Γαλλία χρησιμοποιήθηκε για την πρόκληση μυϊκής χαλάρωσης κατά τη διάρκεια χειρουργικής επέμβασης³.

Η μελέτη αυτή οδήγησε τελικά σε ένα συνθετικό μυοχαλαρωτικό, το ατακουριουμ (*atacurium*), το οποίο αναπτύχθηκε στις αρχές του 1970. Η ανακάλυψη του κουραρίου αποτελεί ένα από τα πολλά επιτεύγματα του κλάδου της εθνοφαρμακολογίας από τον οποίο στη συνέχεια προέκυψαν και άλλα σημαντικά φάρμακα όπως η κινίνη, η κολχικίνη, οι γλυκοσίδες της δακτυλίτιδας, η μορφίνη, η κωδεΐνη, η παπαβερίνη, η φυσοστιγμίνη και η πιλοκαρπίνη. Εύκολα εξάγονται τα συμπεράσματα της μεγάλης συνεισφοράς των πληροφοριών τοπικών κοινωνιών στις σύγχρονες φαρμακοποιίες αλλά και της ανάγκης ύπαρξης πληθώρας σχολαστικών μελετών οι οποίες να προέρχονται από ποικίλους επιστημονικούς κλάδους. Στο πρώτο μισό του 20^{ου} αιώνα η εθνοφαρμακολογία παραμένει ως ένα καλώς καθορισμένο και ολοκληρωμένο κομμάτι των βιολογικών και φαρμακευτικών επιστημών. Στα μέσα του 20^{ου} αιώνα, οπότε συμβαίνει και η ανακάλυψη των αντιβιοτικών, ο τομέας αυτός χάνει την αξία του. Ο κλάδος επανέρχεται με τον δημοσιογράφο R. Gordon Wasson (1898-1986) ο οποίος μαζί με την σύζυγό του επικεντρώνουν το ενδιαφέρον τους στη μελέτη παραισθησιογόνων μανιταριών και φυτών. Ο ίδιος και η ομάδα του αφιερώνουν μεγάλο κομμάτι του ελεύθερου χρόνου τους στην παρακολούθηση τελετουργικών Μεξικανικών κοινωνιών που τους μούν στη χρήση μανιταριών του είδους *Psilocybe* spp. Τα αλκαλοειδή ψιλοκυβίνη και ψιλοκίνη ήταν οι υπεύθυνοι βιοδραστικοί δευτερογενείς μεταβολίτες του μανιταριού³.

Αξίζει να σημειωθεί ότι σε καμία από τις προαναφερθείσες περιπτώσεις δεν υπήρξε αναγνώριση της προσφοράς του λαού που έδωσε την πληροφορία και σεβασμός της βιοποικιλότητας. Στις σύγχρονες μελέτες αυτό δεν συμβαίνει πια. Πλέον υπάρχουν κανονισμοί και διμερείς συμφωνίες που εξασφαλίζουν την προστασία των δικαιωμάτων και των βιολογικών πηγών των λαών που κατέχουν μια σημαντική πληροφορία. Η πιο γνωστή συνθήκη που θεσπίστηκε είναι η "Σύμβαση του Ρίο" ή "Σύμβαση για την Βιοποικιλότητα" η οποία ορίζει σαφώς τα δικαιώματα της πλευράς που παρέχει την εθνοφαρμακολογική της πληροφορία και τις υποχρεώσεις της πλευράς που την ανακαλύπτει και εκμεταλλεύεται εν συνεχεία. Τονίζεται ο σεβασμός προς το περιβάλλον και την βιοποικιλότητα της εκάστοτε περιοχής, η ισομερής κατανομή των όσων προκύπτουν από την κάθε εθνοφαρμακολογική ανακάλυψη (π.χ. οικονομικά οφέλη), η συναίνεση της τοπικής κοινωνίας σε κάθε βήμα της μελέτης. Μια πραγματικά εθνολογικά (ή ανθρωπολογικά) κατευθυνόμενη έρευνα φαρμακευτικών φυτών απαιτεί όχι μόνο τη σε βάθος κατανόηση αυτών των φαρμάκων αλλά και την υποστήριξη των αυτόχθονων λαών να κάνουν μια καλύτερη και σε κάποιες περιπτώσεις πιο ασφαλή χρήση των προϊόντων τους³.

Σημαντικό επίτευγμα το οποίο εντάσσεται στα πλαίσια της εθνοφαρμακολογικής αναζήτησης αποτελεί η ανακάλυψη της σεσκιτερπενικής λακτόνης, αρτεμισινίνης (Εικόνα 3). Το φυτό *Artemisia annua* L. (Asteraceae) χρησιμοποιείται στην Κίνα για περισσότερα από 2000 έτη ως θεραπεία ποικίλων ασθενειών και ειδικότερα ενάντια δερματικών παθήσεων και της ελονοσίας. Υπάρχουν επίσης γραπτές μαρτυρίες του 200 π.Χ., όπως είναι το Fifty – two prescriptions, το οποίο ανακαλύφθηκε στους τάφους της δυναστείας Mawangdui Han. Η ανθελονοσιακή δράση της αρτεμισινίας καθώς και οι σχετικές συνταγές εντοπίζονται στο έργο του Zhouhou Beiji Fang, 'Εγχειρίδιο φαρμακευτικών συνταγών σε καταστάσεις ανάγκης' ('The Handbook of prescriptions for emergencies), το οποίο εκδόθηκε κατά τα μέσα του 4^{ου} αιώνα από τον Κινέζο αλχημιστή, βοτανολόγο και φιλόσοφο Ge Hong. Το 1960 ο στρατός της Κίνας ανέλαβε την υλοποίηση ενός σημαντικού ερευνητικού προγράμματος (Πρόγραμμα 523 (Project 523)). Στόχος αυτού ήταν η ανακάλυψη ενός αποτελεσματικού και οικονομικού φαρμάκου κατά της ελονοσίας το οποίο θα προέκυπτε μέσα από τη μελέτη αρχαίων κινεζικών παραδοσιακών φαρμακευτικών συνταγών φυτικής προέλευσης. Η εντολή για την εκτέλεση του προγράμματος 523 δόθηκε από τον τότε πρόεδρο της Κίνας, Μάο Τσε Τουνγκ (1893-1976) κατόπιν έκκλησης των ηγετών του Βορείου Βιετνάμ προς την τότε σύμμαχο χώρα, Κίνα, για την ανεύρεση μιας ισχυρής

θεραπείας κατά της ελονοσίας, η οποία μάζιζε τον στρατό στις παραποτάμιες ελώδεις περιοχές (Πόλεμος του Βιετνάμ, 1961-1975). Το 1972, στα πλαίσια του προγράμματος το οποίο δειξαγόταν την ίδια ώρα σε 60 ανεπαρκώς εξοπλισμένα εργαστήρια, η Κινέζα ερευνήτρια-φαρμακοποιός, Youyou Tu (1930), με ειδικότητα στη Φαρμακευτική Χημεία, είχε αναλάβει ανάμεσα σε άλλα την ανάλυση του παραδοσιακού φαρμάκου που βασιζόταν στο φυτικό είδος qing hao (αρτεμισία). Η γενικότερη μεθοδολογία περιλάμβανε την ανάπτυξη παρασκευασμάτων των υπό εξέταση βοτάνων σε θερμό νερό (βρασμός) και τον επακόλουθο έλεγχο της ανθελονοσιακής δράσης του εγχύματος *in vivo* σε μύες που είχαν μολυνθεί από το παράσιτο της ελονοσίας. Τα αρχικά αποτελέσματα δεν ήταν ενθαρρυντικά για το έγχυμα της αρτεμισίας. Ωστόσο η Youyou Tu ανατρέχοντας και μελετώντας πιο προσεκτικά το αντίστοιχο χειρόγραφο, παρατήρησε ότι δεν γινόταν καμία αναφορά σε 'θερμή εκχύλιση'. Εν συνεχεία διαπίστωσε ότι μόνο το εκχύλισμα των φύλλων του φυτού που είχε προέλθει από κατεργασία με ψυχρό νερό ήταν αποτελεσματικό έναντι του πλασμοδίου. Πλέον συμπεραίνουμε ότι με τη θέρμανση πιθανώς συνέβαινε καταστροφή του υπεροξειδικού δεσμού της αρτεμισινίνης, στοιχείο απαραίτητο για την εκδήλωση της δράσης. Επιπλέον η ίδια επισήμανε την ανάγκη απομάκρυνσης του τοξικού όξινου κλάσματος του εκχυλίσματος πριν τη χορήγηση του στα πειραματόζωα. Ακολούθησε χορήγηση του φαρμάκου σε ασθενείς της επαρχίας Hainan οι οποίοι είχαν προσβληθεί από τα *Plasmodium vivax* και *Plasmodium falciparum* όπου αποδείχθηκαν η έλλειψη τοξικότητας και η ταχεία εξαφάνιση συμπτωμάτων (πυρετός και παράσιτα στο αίμα) σε αντίθεση με το μέχρι τότε ισχυρότερο ανθελονοσιακό φάρμακο, χλωροκίνη. Το εν λόγω παρασκεύασμα αποτέλεσε το δραστικότερο μέσα από έναν κατάλογο πέντε χιλιάδων παραδοσιακών φυτικών παρασκευασμάτων. Ακολούθως η Youyou Tu απομόνωσε το υπεύθυνο βιοδραστικό προϊόν qing hao su (αρτεμισινίνη). Για την ανακάλυψή της αυτή καθώς και για τη σύνθεση του παραγώγου, διϋδροαρτεμισινίνη ή αρτεμινόλη, και τη μελέτη των ανθελονοσιακών τους ιδιοτήτων, η ερευνήτρια τιμήθηκε αρκετά χρόνια μετά με το βραβείο Lasker στη Φαρμακευτική Χημεία (2011) και με το βραβείο Νόμπελ Φυσιολογίας και Ιατρικής (2015). Με τα βραβεία αυτά τιμούνται επιστήμονες που ανακάλυψαν φάρμακα αποτελεσματικά για την καταπολέμηση κοινών ασθενειών σε όλο τον κόσμο^{4 5}.



Εικόνα 3. Η επιστήμονας Youyou Tu η οποία ανακάλυψε την αρτεμισινίνη

Στόχος της εθνοφαρμακολογίας δεν είναι πάντοτε η ανεύρεση ενός βιοδραστικού φυσικού προϊόντος το οποίο είτε το ίδιο είτε κάποιο παράγωγό του θα αναπτυχθεί σε φάρμακο, αλλά η ανάδειξη σε ορισμένες περιπτώσεις ενός παρασκευάσματος, μιας συνταγής η οποία προέρχεται από τη φύση, και χρησιμοποιείται από μια κοινωνία. Ο κλάδος αυτός λειτουργεί συμπληρωματικά και περισσότερο στοχευμένα σε σχέση με την κλασική βιοκατευθυνόμενη μελέτη εθνοβοτανικών πληροφοριών. Παραμένει κοντά στην αρχική πληροφορία, λειτουργεί σε μικρή κλίμακα και οι αντίστοιχοι ερευνητές εξετάζουν φαινόμενα ανταγωνισμού, συνέργειας, οξείας και χρόνιας τοξικότητας των προτεινόμενων από την παραδοσιακή θεραπευτική παρασκευασμάτων. Μια ολοκληρωμένη και βιο-πολιτισμική προσέγγιση της εθνοφαρμακολογίας λαμβάνει υπόψιν τις ποικίλες, πολύπλοκες και αλληλεπικαλυπτόμενες πτυχές της χρήσης των φυτών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από τις κοινωνικοπολιτικές σχέσεις, τα κριτήρια που χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση των θεραπευτικών ειδών (π.χ. το κόκκινο χρώμα των φυτών πιθανόν λειτουργούσε σαν μνημονικός κανόνας και σήμαινε για τους Ιθαγενείς της Αμερικής, φάρμακο για τη θεραπεία των πληγών, κάτι που εξηγείται εν μέρει από την ύπαρξη κόκκινων κινονών οι οποίες δίνουν το χρώμα στο φυτό και φέρουν αιμοστατικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες), τα παρασκευάσματα και τις αλληλεπιδράσεις βοτάνων και φαρμάκων. Όπως στις άλλες θεραπευτικές μεθόδους, έτσι και στην θεραπευτική εφαρμογή και επίσημη καθιέρωση των παραδοσιακών φυτικών φαρμακευτικών προϊόντων (Traditional Herbal Medicinal Products, THMP), η μακρόχρονη χρήση τους αποτελεί τη βάση της ανάπτυξής τους. Πολλοί οργανισμοί, τόσο σε ευρωπαϊκό όσο και σε διεθνές επίπεδο, έχουν συνεισφέρει σε αυτό. Για παράδειγμα, από το 2004, η Επιτροπή για τα Φυτικά Φαρμακευτικά Προϊόντα (HMPC) του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Φαρμάκων (EMA) έχει συμβάλει σημαντικά στην ενσωμάτωση κατευθυντήριων οδηγιών για την καθιέρωση των παραδοσιακών φυτικών φαρμακευτικών

προϊόντων (ΤΗΜΡ), τόσο μέσω της αξιολόγησης επιστημονικών δεδομένων για μεγάλο αριθμό παραδοσιακά χρησιμοποιούμενων θεραπειών, αλλά και μέσω της θέσπισης αντίστοιχων μονογραφιών. Ωστόσο η επιστημονική κοινότητα θεωρεί ότι θα πρέπει να πραγματοποιηθεί πιο αυστηρή αξιολόγηση των ιστορικών δεδομένων. Προκειμένου να γίνει βέβαιο ότι η θεραπευτική χρήση ενός προϊόντος συμφωνεί με τις απαιτήσεις της σύγχρονης ιατρικής, κρίνεται απαραίτητο ότι όλα τα σχετικά δεδομένα, όχι μόνο αυτά που προβλέπονται από τις ισχύουσες διατάξεις (π.χ. 30 χρόνια συνεχούς αναφοράς του προϊόντος), αξιολογούνται και εκτιμώνται επιστημονικά. Οι επιστημονικές μέθοδοι και η ανάλυση της ιστορικής διάστασης μιας παραδοσιακά εφαρμοζόμενης θεραπείας είναι εξίσου βαρύνουσας σημασίας ώστε να είναι σίγουρο ότι ο ασθενής θα χρησιμοποιήσει ένα προϊόν ασφαλές, αποτελεσματικό και ποιοτικό ⁶.

2 Εθνοφαρμακολογικές πηγές

2.1 Η θεραπευτική στην Ελλάδα-Μια σύντομη ιστορική αναδρομή

Η φιλοσοφία και η πρακτική της ιατρικής που αναπτύχθηκαν στην Ελλάδα κατά την πάροδο των ετών έχουν επηρεάσει τη διαμόρφωση της ιατρικής επιστήμης παγκοσμίως σε

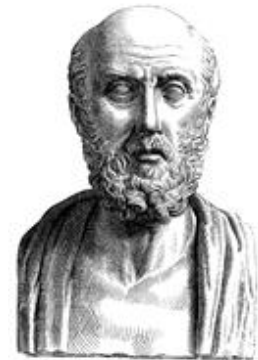


Εικόνα 4. Τοιχογραφία του 1ου αι. μ.Χ. η οποία φυλάσσεται στο αρχαιολογικό μουσείο της Νάπολι και απεικονίζει από αριστερά τους Απόλλωνα, Κένταυρο Χείρωνα και Ασκληπιό.

μεγάλο βαθμό. Η έναρξη της Ελληνικής θεραπευτικής είναι δύσκολο να προσδιοριστεί με ακρίβεια αν και πιστεύεται ότι τοποθετείται περίπου στο 3000 π.Χ., ενώ διακρίνεται στις εξής περιόδους: 1. θρησκευτική 2. φιλοσοφική και 3. πειραματική. Πιο συγκεκριμένα η θεραπευτική των αρχαίων Ελλήνων διαιρείται περαιτέρω σε προϊπποκρατική (3000 π.Χ. – 5^{ος} αιώνας π.Χ.), ιπποκρατική (5^{ος} αιώνας – 3^{ος} αιώνας π.Χ.) και ελληνιστική ή αλεξανδρινή περίοδο που ξεκινά από τον 3^ο αιώνα π.Χ. και φθάνει μέχρι περίπου το 641 μ.Χ. (κατάληψη της Αλεξάνδρειας από τους Άραβες). Τα στοιχεία που είναι γνωστά για την προϊπποκρατική περίοδο προέρχονται από μη ιατρικά έργα όπως αυτά του Ομήρου και του Ησίοδου. Τότε η ιατρική ήταν θεοκρατική, θεωρούσαν δηλαδή ότι οι ασθένειες προέρχονταν από τους θεούς και οι ιερείς ως μεσάζοντες είχαν την ευθύνη της θεραπείας. Πρωταγωνιστές της περιόδου ήταν ο Απόλλωνας (γιατρός των θεών) αλλά και άλλες θεότητες (όπως η Αθηνά, η Ήρα) και ημίθεοι. Η Εκάτη στα Ορφικά εμφανίζεται ως προστάτιδα των φαρμακευτριών και μαγισσών ενώ διατηρεί βοτανικό κήπο φαρμακευτικών ειδών, η Μήδεια,

κόρη της Εκάτης, μαθαίνει την τέχνη από την μητέρα της, η θεία της Κίρκη είναι αυτή που παρουσιάζεται από τον Όμηρο να δίνει παρασκεύασμα που προκαλεί απώλεια της μνήμης στους συντρόφους του Οδυσσέα ενώ δάσκαλος τους ήταν ο κένταυρος Χείρωνας, γιός του Κρόνου και αδελφός του Δία, ο οποίος ζούσε στο Πήλιο με τα πολυάριθμα φυτά και βότανα. Κατά τα τέλη του 6^{ου} αιώνα διαμορφώνεται η λατρεία του Ασκληπιού, γιου του Απόλλωνα και της θνητής Κορωνίδας. Διδάχθηκε την ιατρική από τον πατέρα του και χρησιμοποιούσε ποικίλα μέσα για τη θεραπεία ασθενειών, όπως τις ρίζες των φυτών, τους καταπραϋντικούς χυμούς αυτών, αλλά και λουτρά, εντριβές ακόμη και μαγικά μέσα. Η θεραπευτική χρήση των δρογών του προσέδωσε τη φήμη μεγάλου θεραπευτή και δικαιολογημένα ο Ησίοδος αναφέρει τον Ασκληπιό ως «Θεό της ιατρικής». Η λατρεία του γινόταν στα ασκληπιεία μαζί με τελετουργικές θεραπείες. Συνολικά υπήρχαν 300 ασκληπιεία σε όλη την Ελλάδα, μερικά από τα οποία αργότερα μετατράπηκαν σε ιατρικές σχολές. Οι διάδοχοί του ονομάστηκαν Ασκληπιάδες (δηλαδή οι ασχολούμενοι με την ιατρική). Κατά την προϊπποκρατική περίοδο οι γιατροί είναι οι ιερείς, οι ασκληπιάδες (του Απόλλωνα), οι θεωρητικοί φιλόσοφοι και οι γυμνασιάρχες (ανάλογοι με τους φυσιοθεραπευτές), ενώ στις γυναίκες, και ιδιαίτερα στην Αθήνα, δεν επιτρεπόταν να εξασκούν το ιατρικό επάγγελμα παραμόνο υπήρχαν μαίες, ομφαλοτόμοι, γιάτραινες⁷.

Προχωρώντας στην υποκρατική περίοδο (φιλοσοφική περίοδος) γίνεται αντιληπτή η μεταμόρφωση της ιατρικής σε επιστήμη, η οποία οφείλεται στον Ιπποκράτη που προσπάθησε να την απαλλάξει από τα στοιχεία της δεισιδαιμονίας, της δοξασίας και να εισάγει τις έννοιες της παρατήρησης και του πειράματος. Ο Ιπποκράτης γεννήθηκε στην Κω, το 460 π.Χ., θεωρείται ο 18^{ος} Ασκληπιάδης, γιός του Ασκληπιάδη Ηρακλείδη και της μαίας Φαιναρέτης, ενώ πέθανε το 377 π.Χ. στην Λάρισα. Μαθήτευσε στο Ασκληπιείο της Κω, διδάχθηκε την ιατρική αρχικά από τον ίδιο του τον πατέρα και εν συνεχεία από τον Ηρόδικο καθώς επίσης ανέπτυξε πνευματική σχέση με τον ρήτορα Γοργία και τον φιλόσοφο Δημόκριτο. Τα στοιχεία για το βίο του αντλούνται μέσα από τη βιογραφία, που συμπεριέλαβε στο έργο του με τίτλο *Βίοι Ιατρών* ο Σωρανός ο Εφέσιος (2^{ος} αιώνας μ.Χ.). Ο Ιπποκράτης ταξίδεψε αρκετά ανά τον τότε γνωστό κόσμο όπου θεράπευε και δίδασκε, ενώ επέστρεψε στην Κω όπου μαζί με τους μαθητές του έγραψε το *Corpus Hippocraticum* (Ιπποκρατική Συλλογή) στην ιωνική διάλεκτο, το οποίο αποτελείται από 59 έργα, ανάμεσα στα οποία κάποια είναι γενικής φύσεως,



Εικόνα 5. Ιπποκράτης

άλλα έχουν περιεχόμενο φυσιολογίας, ανατομίας, γυναικολογίας, χειρουργικής, παιδιατρικής κ.λ.π. και απευθύνονται σε διαφορετικά ακροατήρια. Γλωσσολογικό και δεοντολογικό δείγμα των ιπποκρατικών αρχών συνιστά ο όρκος του. Στα βιβλία της Ιπποκρατικής Συλλογής αριθμούνται 236 φυτικά φάρμακα, χωρίς όμως να υπάρχει περιγραφή του κάθε βοτάνου. Ο Ιπποκράτης ανέπτυξε τη δική του θεωρία και ίδρυσε τη δική του σχολή, σε μια εποχή όπου σε όλη τη χώρα ήκμαζαν τα Ασκληπιεία, στα οποία κύρια θεραπεία αποτελούσε ο εξαγνισμός του σώματος και της ψυχής αφού η ασθένεια θεωρούνταν θεόσταλη. Ήταν αυτός που έφερε την επανάσταση διδάσκοντας την ορθολογική σκέψη στην αντιμετώπιση των ασθενειών. Όπως υποστήριζε, τα αίτια είναι λογικά και απαιτούν λογικά θεραπευτικά μέσα, ενώ δεν έκανε δεκτό το στοιχείο της θεϊκής παρέμβασης. Πρώτος ο Ιπποκράτης ταξινόμησε συστηματικά την ιατρική και επιχείρησε μια μεθοδευμένη θεραπεία των νοσημάτων. Η προσέγγισή του ως προς την κλινική σημειολογία, τη διάγνωση, τη θεραπεία, την πρόγνωση και την πρόληψη των ασθενειών είναι τόσο ακριβής ώστε ακόμη και σήμερα γίνονται αποδεκτές ορισμένες μέθοδοι που πρότεινε. Η Ιπποκρατική μεθοδολογία έχει τρεις θεμελιώδεις αρχές: την κλινική παρατήρηση, την εμπειρία και τον ορθολογισμό και στηρίζεται στη νοσολογική τριαδική αρχή: άρρωστος, αρρώστια και ιατρός. Η παγκόσμια αναγνώρισή του ως “πατέρας της ορθολογικής ιατρικής” αποτελεί απόδειξη της τεράστιας αξίας του καινοτόμου έργου του το οποίο αποτέλεσε οδηγό και επηρέασε την εξέλιξη της ιατρικής καθ’όλη τη διάρκεια⁷.

Η δημιουργία της βοτανικής επιστήμης, όπως συμβαίνει και με τις περισσότερες επιστήμες, οφείλεται σε μεγάλο βαθμό, στους αρχαίους Έλληνες φιλοσόφους. Ο Αριστοτέλης (384 π.Χ.-322 π.Χ.), γιός της Ασκληπιιάδας Φαιστιάδας και του Ασκληπιάδη Νικόμαχου, γιατρού του βασιλιά της Μακεδονίας Αμύντα Γ', μύηθηκε από τον πατέρα του στις φυσικές επιστήμες. Σε ηλικία 17 ετών πήγε στην Αθήνα όπου μαθήτευσε δίπλα στον Πλάτωνα επί 20 χρόνια. Ο Αριστοτέλης είναι ο ιδρυτής της Περιπατητικής Σχολής, πατέρας της ζωολογίας, θεμελιωτής των φυσικών επιστημών και το έργο του επηρέασε την επιστημονική κοινότητα επί 2000 έτη. Συνεχιστής του Αριστοτέλη θεωρείται ο φιλόσοφος Θεόφραστος ο Ερέσιος (372 π.Χ.–περ. 287/5 π.Χ.), ο οποίος τον διαδέχτηκε στη διεύθυνση της Περιπατητικής Σχολής. Ο Θεόφραστος θεωρείται ο πατέρας της Βοτανικής και της Ορυκτολογίας. Ο ίδιος έγραψε ίσως 240 βιβλία ποικίλου περιεχομένου όπως φιλοσοφικά, πολιτικά κ.λ.π. Φαρμακογνωστικά έργα του είναι τα *Περί φυτών ιστορία* (9 βιβλία με θέμα



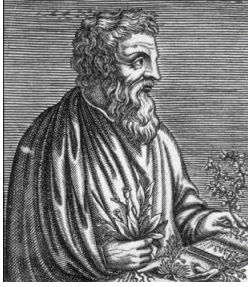
Εικόνα 6. Θεόφραστος ο Ερέσιος

ιστορία, ανάπτυξη - καλλιέργεια, μορφολογία και γεωγραφική προέλευση φυτών, θεμελιώνονται οι βάσεις της Βοτανικής) και *Περί φυτών αιτίαι* (6 βιβλία, συνέχεια του προηγούμενου έργου). Σήμερα σώζονται κυρίως αποσπάσματα του έργου του, αλλά και τρία πλήρη κείμενα, τα οποία είναι: *Περί Φυτών Ιστορία*, *Περί Φυτών Αιτίαι* καθώς και το πλέον γνωστό του έργο, *Χαρακτήρες*. Αξιοσημείωτες είναι οι περιγραφές στα φαρμακογνωστικά και φυτολογικά του έργα. Στα συγγράμματα του περιλαμβάνονται οι παρατηρήσεις ριζοτόμων, ιατρών και έμπειρων αγροτών, αλλά και όλες οι γνώσεις των δικών του παρατηρήσεων. Η εξέταση των φυτών είναι λεπτομερής και χωρίς τις προκαταλήψεις της εποχής του, πολλές δε περιγραφές ευρίσκονται στο ύφος των καλύτερων νεωτέρων περιγραφών. Ο αριθμός των φυτών τα οποία αναφέρονται στα έργα του ανέρχεται στα 550. Η διαίρεση των φυτών γίνεται σε δέντρα, θάμνους, φρύγανα και πόες, και οι πόες σε λαχανευόμενες, κοσμητικές και φαρμακευτικές. Ο Θεόφραστος ήταν ο ιδρυτής πολλών βοτανικών όρων όπως: ανθήλη, θύιον, κόρσιον, κράνον, κώδυον, πέτασος, πέρσιον, φαυλία, μασίχη και άλλων. Αυτός πρώτος διέκρινε κάτω από το φλοιό των φυτών το κάμβιο (το κάμβιο είναι το ζωντανό κομμάτι του κορμού όπου γίνονται όλες οι διεργασίες όπως: κυτταροδιαίρεση, μεταφορά θρεπτικών στοιχείων κ.τ.λ.), ότι όλα τα φύλλα συντελούν στη θρέψη των φυτών, καθώς και ότι, κάθε φυτό έχει συγκεκριμένη περιοχή εξάπλωσης, ενώ, πολύ αργότερα, κατά το Μεσαίωνα, οι τότε βοτανολόγοι, που δεν το γνώριζαν αυτό, προσπαθούσαν να προσομοιάσουν τη χλωρίδα της μέσης Ευρώπης με τα φυτά που είχε περιγράψει ο Θεόφραστος. Μάλιστα ο ενδημικός φοίνικας της Νότιας Ελλάδας, γνωστός ως φοίνικας του Θεόφραστου (*Phoenix theophrastii*), έχει ονομασθεί έτσι προς τιμήν του καθώς εκείνος επισήμανε πρώτος την ύπαρξη του είδους στον ελλαδικό χώρο⁷.

Κατά την αλεξανδρινή περίοδο (3^{ος} αιώνας π.Χ.) επικρατεί η πειραματική παρατήρηση ενώ εμφανίζονται τρεις Σχολές: 1. των Δογματικών (Ερασίστρατος), 2. του Ηρόφιλου (πρόδρομος της πολυφαρμακίας) και 3. των Εμπειρικών, που ακολούθησε φιλοσοφικές θεωρίες, έδωσε ορισμούς και προώθησε την ανάπτυξη της φαρμακολογίας. Γενικότερα ιατροί οι οποίοι θεωρούνται σημαντικοί για τη Φαρμακευτική και άσκησαν το έργο τους κατά την αλεξανδρινή περίοδο είναι ο Ηρόφιλος (335 π.Χ.-280 π.Χ.), ο Ερασίστρατος (304 π.Χ.-257 π.Χ.), ο Απολλόδωρος ο ιολόγος (3^{ος} αιώνας π.Χ., ιατρός στην Αλεξάνδρεια, έγραψε τα έργα *Περί θανασίμων ή δηλητηρίων φαρμάκων* και *Περί ιοθόλων ζώων*), ο Απολλώνιος ο Μυς (πιθανώς δεύτερο μισό 1^{ου} αιώνα π.Χ., μεταξύ άλλων έγραψε το έργο *Περί Αντιδότων*), ο Φιλόξενος Κλαύδιος ο Αλεξανδρεύς (τέλη 1^{ου} αιώνα π.Χ.) κ.ά.⁷

Τα πρώτα ελληνικά συγγράμματα που πραγματεύονται επιστημονικά περί φυτών ήταν αυτά των ριζοτόμων και των φαρμακοπωλών, ενώ μεγάλη ήταν η συμβολή των γεωπόνων οι οποίοι μπορούν να θεωρηθούν ως εκπρόσωποι της εφαρμοσμένης βοτανικής. Ο όρος ριζοτόμοι αναφερόταν σε αυτούς που ασχολούνταν με την εξόρυξη ριζών, τη συλλογή βοτάνων και την καλλιέργεια των φαρμακευτικών φυτών τα οποία προμήθευαν σε γιατρούς ή ασθενείς. Αντικείμενό τους ήταν η θεραπευτική χρήση των φυτών και ιδιαίτερα των ριζών τους. Αναφορές που σχετίζονται με το έργο τους συναντούμε ήδη από την εποχή του Ιπποκράτη και εν συνεχεία από το Θεόφραστο, το Διοσκουρίδη, τον Πλίνιο και το Γαληνό. Από τον Πλίνιο οι ριζοτόμοι κατατάσσονταν σε αυτούς που ανέφεραν τα φυτά, σε αυτούς που περιέγραφαν τα φυτά και σε αυτούς που απέδιδαν ενέργεια στα φυτά. Οι σημαντικότεροι εκπρόσωποι είναι ο Κρατεύας ο ΙΙ (1^{ος} αιώνας π.Χ.), ο οποίος ήταν ιατρός του Μιθριδάτη VI του Ευπάτορος και έγραψε το πρώτο βοτανολόγιο με έγχρωμες εικόνες που έφερε τον τίτλο *Ριζοτομικόν* και ο Διοκλής ο Καρύστιος (375 π.Χ.–295 π.Χ.). Ο δεύτερος ήταν οπαδός της Δογματικής Σχολής και αποτέλεσε ιατρό και συγγραφέα πολλών αξιόλογων ιατρικών έργων. Ως ριζοτόμος, συνέγραψε και αυτός το *Ριζοτομικόν*, το οποίο θεωρείται το αρχαιότερο φαρμακογνωστικό έργο. Σε αυτό περιγράφονται τα φυτά, η ιατρική τους χρήση, τα συνώνυμα και ο τρόπος κατά τον οποίον πρέπει να συλλέγονται. Από τα συγγράμματα του Διοκλή διασώθηκαν αποσπάσματα, θεωρείται δε ότι αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα για τα έργα του Θεόφραστου, του Διοσκουρίδη και του Πλίνιου⁷.

Ο Νίκανδρος ο Κολοφώνιος (197 π.Χ.-130 π.Χ.) (βλ. κατωτέρω) ήταν ποιητής, ιατρός ο οποίος άνηκε στην Εμπειρική Σχολή (3^{ος} αιώνας π.Χ.-3^{ος} αιώνας μ.Χ.), καταγόταν από την Κλάρο της Κολοφώνας (Μ. Ασία) και έγραψε μεταξύ άλλων δύο ποιήματα τα *Θηριακά* (958 στίχοι) και τα *Αλεξιφάρμακα* (631 στίχοι). Το πρώτο περιγράφει είδη δηλητηριωδών ζώων και ερπετών και τρόπους αντιμετώπισής τους ενώ το δεύτερο είναι συνέχεια του πρώτου και εκεί αναφέρονται 8 ζωικά, 11 φυτικά και 2 ορυκτά δηλητήρια. Έγραψε και άλλα έργα όπως *περί ιάσεων συναγωγή*, *συλλογή θεραπευτικών οδηγιών*, *εξηγητικά εις Ιπποκράτη* κ.ά. Με τον Νίκανδρο σταματά η δράση της Εμπειρικής Σχολής στη Μ. Ασία καθώς μετά την κατάκτηση της Ανατολής από τους Ρωμαίους, ιατροί, ρήτορες, καλλιτέχνες και φιλόσοφοι από την Ελλάδα, την Ιωνία και την Αλεξάνδρεια μετανάστευσαν στη Ρώμη⁷.



Εικόνα 7. Διοσκουρίδης

Ο Πεδάνιος Διοσκουρίδης ο Αναζαρβεύς (περίπου 10 μ.Χ.-90 μ.Χ.) αποτέλεσε σημαντικό ιατρό, ριζοτόμο, βοτανολόγο, φαρμακολόγο της ύστερης αλεξανδρινής περιόδου. Καταγόταν από την Ανάζαρβα της Κιλικίας. Αν και λίγα πράγματα είναι γνωστά για τη ζωή του, είναι βέβαιο ότι σπούδασε φιλοσοφία και επιστήμες στην Ταρσό και στην Αλεξάνδρεια. Ως στρατιωτικός ιατρός είχε την ευκαιρία να παράγει φαρμακολογικό έργο παρατηρώντας τη χρήση των φυτών κυρίως στις Μεσογειακές χώρες. Θεωρείται ο μεγαλύτερος φαρμακολόγος της αρχαιότητας, η επιστημονική προσφορά του οποίου πιστεύεται ότι ήταν εφάμιλλη με εκείνη του Θεοφράστου του Ερέσιου στη Βοτανική. Έγινε γνωστός για το πεντάτομο έργο του *Περί Ιατρικής Ύλης (De Materia Medica)* το οποίο έγραψε πιθανώς το 77 ή 78 μ.Χ. ενώ αυτό παρέμεινε σε ευρεία χρήση μέχρι περίπου το 1600 μ.Χ. Το έργο του μεταφράστηκε σε πολλές γλώσσες κατά τις διάφορες εποχές. Εκεί ο Διοσκουρίδης αναλύοντας συστηματικά τα φυτικά (794) , τα ζωικά (104) και τα ορυκτά (105) προϊόντα, φτάνει σε ένα σύνολο 1003 διαφορετικών δρογών, οι οποίες αναμειγνυόμενες μεταξύ τους συγκροτούν ένα τεράστιο συνταγολόγιο. Όπως επισημαίνει ο Ε. Μπάουμαν στο βιβλίο του *Η Ελληνική Χλωρίδα*, οι γνώσεις για τις θεραπευτικές ιδιότητες της φύσης χάνονται στα βάθη των αιώνων, και την πρώτη καταγραφή της θεραπείας με βότανα την οφείλουμε στο Θεόφραστο. Όμως το κατόρθωμα του Διοσκουρίδη είναι ότι είχε αναγνωρίσει ως θεραπευτικά 500 περίπου φυτά ενώ σε συγκεκριμένο παράρτημα αναφέρεται στα δηλητήρια και στα αντίδοτά τους. Το έργο αυτό ήταν ήδη πολύ γνωστό στην εποχή του Γαληνού (130-199 μ.Χ.) και μεταφράστηκε στα συριακά, στα λατινικά και στα αραβικά. Το σύγγραμμα του Διοσκουρίδη, που μπορεί να θεωρηθεί ως το πρώτο (διασωθέν) σύγγραμμα φαρμακολογίας, επηρέασε σημαντικά τους επόμενους ιατρούς - συγγραφείς, ανάμεσα στους οποίους και το Γαληνό. Μετά τη μετάφρασή του στα λατινικά, αποτέλεσε για τη Δύση το κλασικό σύγγραμμα αναφορικά με τα φάρμακα για τους επόμενους αιώνες. Ήταν ακόμα κύρια πηγή για ιατρικά συγγράμματα, για τα βοτανολόγια της Αναγέννησης και αργότερα για τις Φαρμακοποιίες⁷.



Εικόνα 8. Γαληνός

Κατά τη ελληνο-ρωμαϊκή περίοδο (146 μ.Χ.-395 μ.Χ.) εξέχουσα προσωπικότητα της θεραπευτικής αποτέλεσε ο Γαληνός (129/131 μ.Χ.-199/201 μ.Χ.). Μετά τον Ιπποκράτη, ήταν ο σπουδαιότερος ιατρός της αρχαιότητας. Θεωρείται ο πατέρας της Φαρμακευτικής. Πηγή των πληροφοριών που αφορούν τη ζωή του αποτελούν τα ίδια του τα έργα.

Γεννήθηκε στην Πέργαμο η οποία εκείνη την εποχή αποτελούσε σπουδαίο οικονομικό κέντρο και εκεί αρχικά σπούδασε την ιατρική. Καταγόταν από εύπορη οικογένεια. Δάσκαλοι του ήταν ο Σάτυρος (μαθητής του Κόιντου, του σπουδαιότερου για την εποχή ανατόμου), ο εμπειρικός ιατρός Αισχρίωνας και ο υποκρατικός ιατρός Στρατόνικος. Το 149 μ.Χ., αφότου απεβίωσε ο πατέρας του, συνέχισε τις σπουδές του στη Σμύρνη δίπλα στον ανατόμο Πέλοπα και τον φιλόσοφο Αλβίνο, ακολούθως στην Κόρινθο κοντά στον ανατόμο Νουμισιανό ενώ μετέβη στην Αλεξάνδρεια όπου μαθήτευσε κοντά στον Ηρακλειανό. Στην Αλεξάνδρεια ασχολήθηκε και με την αστρονομία. Το 157 μ.Χ. επέστρεψε στην Πέργαμο όπου διορίστηκε ιατρός των μονομάχων χάρη στη μεγάλη φήμη που είχε αποκτήσει. Τελικά το 162 μ.Χ. μετακινήθηκε στη Ρώμη η οποία αποτελούσε το μεγαλύτερο κέντρο άσκησης της ιατρικής. Στη Ρώμη, όπου αρχικά παρέμεινε για τέσσερα έτη, ίδρυσε επί της Ιεράς οδού κατάστημα (*αποθήκη*), στο οποίο παρασκεύαζε ο ίδιος τα φάρμακα. Έπειτα από κάποιες εντάσεις που δημιουργήθηκαν ανάμεσα στο Γαληνό και κάποιους επικριτές του, αναγκάστηκε να γυρίσει πίσω στην Πέργαμο και να διαμείνει εκεί για δύομισα χρόνια. Το 168 μ.Χ. καλείται από τους αυτοκράτορες Μάρκο Αυρήλιο και Λεύκιο Βέρο να αναλάβει καθήκοντα ιατρού στην εκστρατεία κατά των γερμανικών φύλων ενώ το ίδιο διάστημα ξεσπά λοιμός με σοβαρότατες απώλειες, οπότε οι αυτοκράτορες επιστρέφουν στη Ρώμη, ενώ ο Γαληνός και άλλοι ιατροί παραμένουν για να αντιμετωπίσουν την επιδημία. Ο Μάρκος Αυρήλιος ανέπτυξε ισχυρή σχέση με το Γαλήνο τον οποίο έπεισε να γυρίσει και να παραμείνει στη Ρώμη όπου και συνέγραψε τα έργα του. Το 192 μ.Χ. μια πυρκαγιά που ξέσπασε κατέστρεψε το σύνολο των έργων του καθώς επίσης και κάποιες δρόγες που φύλασσε στην *αποθήκη* επί της Ιεράς οδού. Τότε ο Γαληνός βρήκε το ψυχικό και σωματικό σθένος, καθώς βρισκόταν σε προχωρημένη ηλικία να συγγράψει εκ νέου τα χαμένα έργα. Έκτοτε περιορίζονται σημαντικά οι αυτοβιογραφικές του πληροφορίες. Ο ίδιος με το έργο του προσπάθησε να συνδέσει τις σημαντικότερες θεωρίες της εποχής του. Έτσι λοιπόν έκανε αποδεκτές τις αρχές της Εμπειρικής Σχολής, *πείρα* (εμπειρία) και *τήρησις* (ιατρική εξέταση), καθώς και τον *λογικό διαστοχασμό* της Δογματικής, που βασιζόταν στη σημασία των συμπτωμάτων, και βοήθησε στη διάγνωση, στην πρόγνωση και θεραπεία της νόσου. Ήταν πολυγραφότατος καθώς έγραψε 125 μη ιατρικά έργα και μεγάλο αριθμό ιατρικών έργων από τα οποία έχουν διασωθεί 83 γνήσια και 48 έχουν δυστυχώς χαθεί ενώ υπάρχουν και μερικά αμφισβητούμενα, νόθα και αποσπάσματα. Μέσω των έργων του διασώθηκαν αποσπάσματα και συνταγές προγενέστερων θεραπειών όπως του Νικάνδρου του Κολοφώνιου, Ηρακλείδη του Ταραντίνου, Αττάλου του Φιλομήτορος κ.λ.π. Τα σημαντικότερα έργα του Γαληνού σχετικά με τη φαρμακευτική είναι τα εξής: *Περί*

κράσεως και δυνάμεως των απλών φαρμάκων (περιλαμβάνει 11 βιβλία, από τα οποία τα 5 πρώτα είναι θεωρητικά, το 6^ο είναι ιστορικό και τα υπόλοιπα περιγράφουν αλφαβητικά τα φάρμακα), *Περί συνθέσεως φαρμάκων των κατά τόπους* (10 βιβλία όπου αναφέρεται κυρίως σε σύνθετα φάρμακα, τα οποία κατηγοριοποιεί ανάλογα με τις ασθένειες των πασχόντων μερών του σώματος αρχίζοντας από παθήσεις του τριχωτού και καταλήγοντας σε παθήσεις των κάτω άκρων, αξίζει να αναφερθεί ότι στο 1^ο βιβλίο συμπεριλαμβάνονται αποσπάσματα έργου με τίτλο *Περί των κοσμητικών*, που αποδίδεται (πιθανόν για λόγους διαφήμισης και εμπορικούς) στη βασίλισσα της Αιγύπτου Κλεοπάτρα), *Περί συνθέσεως φαρμάκων των κατά γένη* (7 βιβλία όπου αναφέρεται σε σύνθετα φάρμακα ανάλογα με τη φύση τους και τις θεραπευτικές ενδείξεις), *Περί αντιδότων* (2 βιβλία), *Περί πτισάνης, Υγιεινών λόγοι* (6 βιβλία), *Περί δυνάμεως φυσικών* (3 βιβλία), *Περί των καθ' Ιπποκράτη στοιχείων* (2 βιβλία), *Περί κράσεων* (3 βιβλία), *Περί ευπορίστων* (όπου περιγράφει τα πρόχειρα φάρμακα των ιατρών και των αδαών αγροτών (πρώτες βοήθειες)). Θεωρείται ο θεμελιωτής της πειραματικής φυσιολογίας ενώ αφιέρωσε μεγάλο χρονικό διάστημα στην μελέτη και στην διδασκαλία της ανατομίας. Η θεωρία του Γαληνού για τη νόσο συμφωνούσε με τη θεωρία των τεσσάρων χυμών του Ιπποκράτη τον οποίο αποδεχόταν ως τον σπουδαιότερο των ιατρών. Μάλιστα στο έργο του *Περί κράσεως και δυνάμεως των απλών φαρμάκων* ανέπτυξε περισσότερο τη χυμοπαθολογία. Στο ίδιο έργο γίνεται η πλήρης ανάπτυξη της ιατρικής του σκέψης. Διατύπωσε σημαντικές θεωρίες για τη λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού. Αξίζει να σημειωθεί ότι με τις νεκροψίες του σε ζώα βρήκε ότι οι αρτηρίες και οι φλέβες μεταφέρουν αίμα και όχι αέρα όπως πίστευαν μέχρι τότε και ήταν σύμφωνες με τις θεωρίες του Ηρόφιλου και του Ερασίστρατου. Ως φάρμακο ορίζει κάθε ουσία που προκαλεί αλλοίωση στο σώμα και μεταβάλλει μία ή περισσότερες από τις πρωταρχικές ποιότητες του ανθρώπινου οργανισμού, ήτοι θερμότητα, ψυχρότητα, υγρότητα και ξηρότητα. Κατατάσσει τα φάρμακα σε απλά (δρόγες φυτικές, ζωικές, ανόργανες) και σύνθετα (αποτελούμενα από περισσότερες της μιας δρόγες) και ανάλογα με τις δραστικές ουσίες σε εμετικά, καθαρτικά, δηλητήρια, αντίδοτα. Σύμφωνα με τον Γαληνό κάθε φορά πρέπει να χρησιμοποιείται το φάρμακο που είναι ικανό να επαναφέρει την ισορροπία των τεσσάρων ποιοτήτων του σώματος μέσω της αυξομείωσης των τεσσάρων χυμών. Έτσι ο ίδιος παρασκεύαζε σύνθετα σκευάσματα που να έχουν τις επιθυμητές ιδιότητες. Στα συγγράμματά του αναφέρει συνταγές και τρόπους παρασκευής φαρμάκων. Ο Γαληνός δεν περιέγραψε τα φυτά, απλώς τα κατονόμασε. Ανάμεσα στα πολύπλοκα παρασκευάσματά του ήταν και η θηριακή την οποία έφτιαχνε μόνος του. Τα συστήματα των ποιοτήτων και της βαθμονόμησης της δραστικότητας των φαρμάκων (ένταση

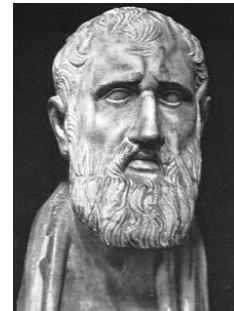
από 1 έως 4) ήταν αποδεκτά μέχρι τα μέσα του 19^{ου} αιώνα. Ως πρότυπο φάρμακο με το οποίο συγκρίνονται όλα τα υπόλοιπα ως προς την διαβάθμιση της δράσης τους όρισε το ελαιόλαδο, που παράγεται στις Κυκλάδες, στην Ελλάδα και στην Ασία. Θεωρούσε ότι είναι το πλέον κατάλληλο καθότι βρίσκεται στο μέσον όλων των υπολοίπων φαρμάκων και το χαρακτηρίζει ως σύμμετρο διότι αποκτά την ίδια κράση με το σώμα στο οποίο χορηγείται ή όταν αναμιγνύεται με κάποια δρόγη αποκτά την ίδια κράση με αυτή. Οι φαρμακοτεχνικές μορφές που χρησιμοποιούσε ήταν ποικίλες. Τα από του στόματος φάρμακα ήταν εκλείγματα και αντίδοτα, που τα χορηγούσε υπό τις ακόλουθες μορφές: σφαιρία, καταπότια, πεπλατυσμένους τροχίσκους, ποτήματα, συνήθως εγχύματα, αφεψήματα, αποζέματα, οινόλυτα, οξόλυτα, μελιτώματα. Τα τοπικής χρήσης φάρμακα χορηγούνταν υπό τη μορφή άκοπων (υγρών μειγμάτων που είχαν σαν βάση μια λιπαρή ουσία), εμπλάστρων (μειγμάτων κηρού με μεταλλικές κόνεις), μαλαγμάτων (φαρμάκων μαλακής σύστασης με βάση κόμμα, ρητίνη, έλαιο, λίπος), επιθεμάτων (τοπικών δερματικών φαρμάκων) και καταπλασμάτων (τοπικών μαλακτικών). Οι σύνθετες φαρμακοτεχνικές μορφές των φαρμάκων που παρασκεύαζε ο Γαληνός απέκτησαν τέτοια σπουδαιότητα ώστε η φαρμακοτεχνία ονομάσθηκε γαληνική^{8 9 10 11}.

Η πρώτη έκδοση συγγραμμάτων του Γαληνού έγινε το 1523 από τον Άλδο Μανούτιο στη Βενετία, σε πέντε τόμους. Το ίδιο συνάβει και στη Βασιλεία της Ελβετίας το 1538. Ακολούθησε η έκδοση του Παρισιού το 1638 και τέλος η συνήθως χρησιμοποιούμενη από τους μελετητές του Γαληνού, έκδοση της Λειψίας του 1621 από τον Car. Gotr. Kühn σε 20 τόμους. Μετά το Γαληνό επήλθαν σκοτεινοί αιώνες στη Δύση. Ο Γαληνός επηρέασε στο μεγαλύτερο βαθμό την εξέλιξη της ιατρικής στη Δύση μέχρι την Αναγέννηση. Τα βιβλία του μεταφράσθηκαν στα Λατινικά και επικράτησαν ως κλασικά συγγράμματα στις ιατρικές σχολές της Ευρώπης⁷.

Η Φαρμακευτική στο Βυζάντιο (5^{ος} αιώνας μ.Χ.-14^{ος} αιώνας μ.Χ.) συνδέεται στενά με την Ιατρική. Αρχικά η θεραπευτική είναι θρησκόληπτη και μυστικιστική, κατόπιν αποκτά μια πιο φιλοσοφική μορφή ενώ καταλήγει βασιζόμενη σε παρατηρήσεις και ορισμένες φορές σε πειράματα. Καθ' όλη τη διάρκεια σημαντικό ρόλο παίζουν τα μοναστήρια με τις βιβλιοθήκες και τα εργαστήρια αντιγραφής κωδίκων ενώ πολλά αποτέλεσαν κέντρα εκπαίδευσης βοτανικών, ιατρικών και φαρμακευτικών επιστημών. Κατά την πρώιμη βυζαντινή περίοδο οι ιατροί εμπιστεύονται τα παλαιότερα έργα θεραπευτικής τα οποία αντιγράφουν (βυζαντινοί κώδικες) ενώ σταδιακά αρχίζουν να προσθέτουν σε αυτά στοιχεία από τη δική τους εμπειρία. Η βυζαντινή ιατρική αποτελεί τη γέφυρα για τη μετάβαση από την αρχαία ελληνική θεραπευτική στην ιατρική

μέχρι τον 18^ο αιώνα μ.Χ. Η ιατρική οργανώνεται ως επιστήμη στα τέλη του 10^{ου} και 11^{ου} αιώνα όπου τα όσα καταγράφονται είναι περισσότερο αποκτήματα των προσωπικών εμπειριών του ιατρού παρά μεταφορές δεδομένων από τα έργα της ελληνο-ρωμαϊκής περιόδου ενώ συγχρόνως στηρίζονται σε μια ορθολογιστική βάση. Τον 12^ο αιώνα ο ιατρός αποκτά εξέχουσα κοινωνική θέση σχεδόν ισάξια με αυτή των λειτουργών και των λογίων. Η Φαρμακευτική ασκείτο από ιατρούς, βοτανικούς, τους πημεντάριους και τους μυρεψούς ("μύρων εψητών", έμποροι βοτάνων και αρτυμάτων). Τα φαρμακευτικά σκεύασματα τα οποία χορηγούσαν προέρχονταν κυρίως από τα έργα του Ιπποκράτη, του Διοσκουρίδη, του Γαληνού και προγενέστερων βυζαντινών ιατρών ενώ σταδιακά προστέθηκαν συνταγές προερχόμενες από τη Φαρμακευτική των Αράβων. Κατά την υστεροβυζαντινή περίοδο γίνεται εμφανής η επίδραση των ανατολικών γλωσσών στους Βυζαντινούς μέσα από τα ιατρικά χειρόγραφα.

Σημαντικοί ιατροί της περιόδου είναι οι εξής: 1) Ορειβάσιος (4^{ος} αιώνας μ.Χ.) ο οποίος ήταν αρχίατρος του αυτοκράτορα Ιουλιανού του Παραβάτη, γεννήθηκε στην Πέργαμο ή στις Σάρδεις της Λυδίας, σπούδασε την ιατρική στην Αλεξάνδρεια ενώ έγραψε 3 έργα με κυριότερο την *Εβδομηκοντάβιβλο* ή *Συναγωγαί ιατρικαί προς Ιουλιανόν* (έχει διασωθεί το 1/3), 2) Αλέξανδρος ο Τραλλιανός (6^{ος} αιώνας μ.Χ.),



Εικόνα 9. Ορειβάσιος

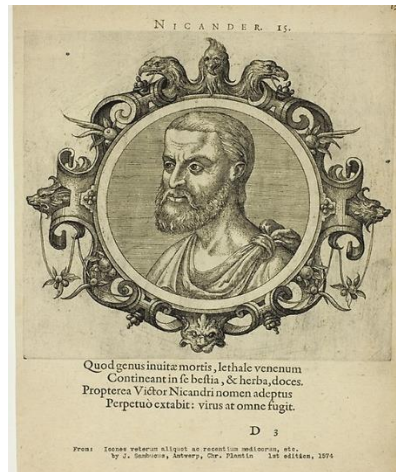
ιατρός, φαρμακολόγος και βοτανολόγος από τις Τράλλεις της Λυδίας (ΝΑ της Σμύρνης), συγγραφέας 12 έργων ιατρικού περιεχομένου με τίτλο *Βιβλία ιατρικά δύο και δέκα* (*Δωδεκάβιβλος*), 3) Αέτιος ο Αμιδηνός (6^{ος} αιώνας μ.Χ.), αρχίατρος του αυτοκράτορα Ιουστινιανού Α', σπούδασε στην Αλεξάνδρεια, καταγόταν από την Αμίδα της Μεσοποταμίας, έγραψε 16 βιβλία με τίτλο *Βιβλία ιατρικά εκκείδεκα* (*Λόγους*), το 13^ο βιβλίο που αναφέρεται σε αντίδοτα και δηλητήρια και περιέχει στοιχεία από τον Νίκανδρο τον Κολοφώνιο, 4) Παύλος ο Αιγινήτης (7^{ος} αιώνας μ.Χ.), "περιοδευτής", *Υπόμνημα* 5) Νικόλαος Μυρεψός ή Νικόλαος Ακτουάριος ή Αλεξανδρινός (12^{ος} αιώνας μ.Χ.)¹², ιατρός, βοτανολόγος και φαρμακολόγος, καταγόταν από την Αλεξάνδρεια, το έργο του *Δυναμερόν* παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον καθώς αποτελεί το εκτενέστερο συνταγολόγιο που έχει υπάρξει ποτέ με 2667 φαρμακευτικά σκεύασματα. Τα ιατροσόφια ή αλλιώς ιατροσοφικοί κώδικες που εντοπίζονται την εποχή αυτή αποτελούν τα συνταγολόγια, τα θεραπευτικά βοηθήματα των ιατρών, φέρουν επιρροές από τους Αρχαίους Έλληνες και βυζαντινούς ιατρούς ενώ κάποιες φορές περιείχαν τμήματα όπως εξορκισμούς τα οποία χρησιμοποιούνταν συγχρόνως με τη χορήγηση φαρμάκων. Η κατάκτηση

της Ελλάδας από τους Οθωμανούς επέφερε μια διακοπή της εξέλιξης της ιατρικής επιστήμης η οποία ασκούσαν μόνο από τους εμπειρικούς⁷.

Από τα τέλη του 16^{ου} αιώνα, όπου επανεμφανίζεται μια πνευματική δραστηριότητα, συναντούμε νέα ιατροσοφικά κείμενα. Πρόκειται για χειρόγραφα βιβλία που περιγράφουν ταξινομημένη την ιατρική ύλη αναφορικά με τις ασθένειες ξεκινώντας από την κεφαλή και τα νοσήματα αυτής και προχωρώντας προς τα άκρα. Γνωρίσματα αυτού του τύπου ιατρικών εγχειριδίων είναι η ποικιλία ως προς την έκταση και τον αριθμό των κεφαλαίων τους, και οι γλωσσικές παραλλαγές, κάτι που σχετίζεται με τη δυνατότητα του συγγραφέα να τροποποιεί με ιδιαίτερη ευκολία την αρχική πηγή πληροφοριών αναλόγως με τα δεδομένα της εποχής. Παρατηρείται μάλιστα σημαντική ομοιότητα μεταξύ των δοσολογιών και των δρογών που χρησιμοποιούνται κατά την παρασκευή των συνταγών μεταξύ των διάφορων έργων. Συνήθως στα έργα αυτά δεν υπάρχει η υπογραφή του συγγραφέα αν και θεωρείται εύκολο να διακριθεί η ταυτότητά του από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της γραφής του, το ύφος κ.ά. Πρόκειται για υπεύθυνα άτομα που όμως δεν είχαν πάντοτε την εμπειρία των όσων κατέγραφαν. Απευθύνονται σε ένα πιο ευρύ κοινό που δεν έχει απαραίτητα ακαδημαϊκές γνώσεις ιατρικής. Μέσω των ιατροσοφικών από τη μια γίνεται δυνατή η διατήρηση της γνώσης της θεραπευτικής που προέρχεται από την κλασική, αλεξανδρινή και βυζαντινή περίοδο και από την άλλη λειτουργούν ως απλουστευμένοι κώδικες για την αντιμετώπιση παθήσεων της εποχής. Τα ιατροσόφια ταξινομούνται στις εξής κατηγορίες: 1) ιατροσόφια που περιλαμβάνουν αμιγώς συνταγογραφική ύλη, η γλώσσα ποικίλει, σε μεταγενέστερα έργα εντοπίζονται συνταγές από αραβικά ή λατινικά κείμενα, 2) ιατροσόφια που περιλαμβάνουν πέραν της φαρμακευτικής ύλης και προσευχές, υμνωδίες και εξορκισμούς τα οποία συνιστούν το αρχικό κομμάτι της θεραπείας, 3) ιατροσόφια που περιελάμβαναν και μαγικές φράσεις, καθώς και αλχημιστικά και καββαλιστικά σημεία και 4) ιατροσόφια ποικίλου περιεχομένου^{7 13}.

Οι προαναφερθέντες θεωρούνται οι σημαντικότεροι εκπρόσωποι της ιατρικής και φαρμακευτικής επιστήμης, χωρίς αυτό να μειώνει τη συμβολή του έργου και άλλων λιγότερο γνωστών συγγραφέων. Στην πραγματικότητα μπορεί να διαπιστώσει κανείς, σε αρκετά μεγάλη έκταση, μια συνέχεια ανάμεσα στις γνώσεις και στα κείμενα που αφορούν σε φάρμακα και φαρμακευτικές θεραπείες σε διάφορες χρονικές περιόδους καθώς και μια αλληλεπίδραση μεταξύ των λαών.

2.2 Νίκανδρος ο Κολοφώνιος – Θηριακά



Εικόνα 10. Πορτραίτο του Νικάνδρου, αγνώστου καλλιτέχνη (1574)

Λίγα πράγματα είναι γνωστά για το Νίκανδρο. Αποτέλεσε Έλληνα ποιητή, ιατρό και γραμματικό της αρχαιότητας (2^{ος} αιώνας π.Χ.). Γεννήθηκε στην Κλάρο, όπου σήμερα βρίσκεται το Ahmetbeyli της Τουρκίας, κοντά στην Κολοφώνα της Ιωνίας, της Μικράς Ασίας. Οι γονείς του διατηρούσαν εκεί το ιερό μαντείο (ιερατείο) του αρχαίου Έλληνα θεού Απόλλωνα και πιθανόν ο πατέρας του ήταν ο Δαμαίος (Damaeus). Άκμασε κατά την βασιλεία του Αττάλου Γ' (Attalus III) της Περγάμου, στον οποίο πιθανολογείται ότι αφιέρωσε ένα από τα έργα του (*Θηριακά*). Ο Άτταλος Γ' κατατάσσεται από το Γαληνό, μαζί με το Μιθριδάτη, στους πειραματιστές των δηλητηρίων, τα οποία χορηγούσαν στους εχθρούς τους προκειμένου να ελέγξουν την αποτελεσματικότητα των αντιδότην. Ο Ιουστίνος χαρακτηριστικά αναφέρει ότι ο βασιλιάς συνήθιζε να σκάβει και να σπέρνει στον κήπο του, να αναμειγνύει βλαβερά με αβλαβή βότανα, τα οποία συνδύαζε με δηλητηριώδεις χυμούς και τα έστελνε αδιακρίτως σαν δώρα στους φίλους του (*Epitome*, XXXVI.4). Ο Νίκανδρος ήταν σύγχρονος του Αράτου και του Θεοκρίτου ενώ ο Ησίοδος θεωρείται ο πατέρας της διδακτικής ποίησης που συνέχισαν οι προαναφερθέντες. Τα έργα του είναι γραμμένα τόσο σε πεζό (prose) όσο και σε ποιητικό-έμμετρο λόγο, συνήθως σε δακτυλικό εξάμετρο όπως ο Όμηρος, με τον οποίο πιθανόν είχαν κοινή καταγωγή, ή ελεγειακό δίστιχο, είναι τουλάχιστον 20 σε αριθμό ενώ πολλά από αυτά έχουν ιατρικό περιεχόμενο¹⁴. Μόνο δύο από τα βιβλία του διασώζονται ολόκληρα μαζί με κάποια σχόλια (scholia). Αυτά είναι: τα *Αλεξιφάρμακα* (*Alexipharmaca*) όπου περιγράφονται διάφορα είδη δηλητηριάσεων από του στόματος που προέρχονται από ζώα, φυτά και ορυκτά, ενώ προτείνονται τα αντίδοτα και οι θεραπείες αυτών. Τα *Θηριακά* (*Theriaca*) πραγματεύονται πιο ειδικά το θέμα των

δηλητηριάσεων που προκαλούνται από δαγκώματα, τσιμπήματα, και εκδορές ζώων. Τα αρχαία σχόλια (scholia) διασώθηκαν μαζί με τα δύο έργα και χρησίμευσαν για την επεξήγηση λέξεων, εκφράσεων, αναφορών του Νικάνδρου αλλά και ως εκτενής περιγραφή των απόψεων των ελληνιστικών συγγραφέων των οποίων τα έργα χάθηκαν. Επίσης σε αυτά υπάρχουν καταγεγραμμένες παραδόσεις και δεισιδαιμονίες της εποχής. Οι τίτλοι των χαμένων έργων (ποιημάτων) του Νικάνδρου είναι τα *Γεωργικά* (*Georgica*) το οποίο αποτελείται από δύο βιβλία, επικεντρώνεται στην καλλιέργεια φυτών που χρησιμοποιούνται στη μαγειρική, σήμερα σώζονται κάποια αποσπάσματα και πιθανόν αυτό μιμήθηκε ο Βιργίλιος, *Μελισσουργικά* (*Melissurgica*), *Ετεριούμενα* (*Heteroeumena*) ήταν μυθολογικό έπος το οποίο χρησιμοποιήθηκε από τον Οβίδιο στο έργο του *Metamorphoses* και η επιτομή έγινε από τον Αντωνίνο Λιβεράλη, και *Προγνωστικά* (*Prognostica*), *Cimmerii*, *Ευρώπεια* (*Europia*), *Hyacinthus*, *Hymnus ad Attalum* ("Hymn to Attalus"), *Οιταϊκά* (*Oetaica*), *Οφιακά* (*Ophiaca*), *Σικέλια* (*Sicelia*), *Θηβαϊκά* (*Thebaica*). Επίσης χαμένα έργα του είναι τα *Αιτωλικά* (*Aetolica*) (History of Aetolia), τα *Colophonica* (History of Colophon), τα *Περί ποιητών* (*De Poetis Colophoniiis*) (On poets from Colophon) (πεζό) και τα *Glossae* (Difficult words) (πεζό)¹⁵.

Οι σύγχρονες κριτικές και αμφισβητήσεις πάνω στον Νικάνδρο και στο συγγραφικό έργο των Θηριακών κινούνται γύρω από δύο βασικούς άξονες: την απουσία ή όχι φιλολογικής αξίας ως ποιήμα και την απουσία ή όχι της πρακτικής του χρησιμότητας ως εγχειρίδιο για την αντιμετώπιση σε δήγματα όφρων. Ο σχολιασμός επί της συγγραφικής δεξιότητας του Νικάνδρου δεν αποτελεί μέρος της παρούσας διατριβής. Η αμφισβήτηση της θεραπευτικής αξίας των Θηριακών πηγάζει κυρίως από κάποιες ελλείψεις και ασάφειες του έργου όπως την κατά τόπους παράλειψη των απαραίτητων ποσοτήτων και τη μη ξεκάθαρη διάκριση ανάμεσα στις συνταγές, την υπόδειξη χρήσης μη πρακτικών συστατικών, την παρουσία στοιχείων δεισιδαιμονίας καθώς και τη δυσκολία κατανόησης του περιεχομένου που προκαλείται λόγω ποιητικού ύφους. Παρότι ο Νικάνδρος αποτελεί μια σκοτεινή μορφή της αρχαιότητας, είναι γενικώς αποδεκτό ότι αποτέλεσε σημαντικό ποιητή της ελληνιστικής εποχής παρότι έγραψε έργα και σε πεζό λόγο, ενώ εξακολουθεί να είναι δύσκολη η επιβεβαίωση της ιδιότητας του ως ιατρός. Πιστεύεται από αρκετούς ερευνητές ότι ο Νικάνδρος δεν διέθετε προσωπική εμπειρία των όσων έγραφε. Υπάρχει μια διαρκής σύγκριση με τον Άρατο (315 π.Χ.-240 π.Χ.), ο οποίος επίσης συνέταξε διδακτικά ποιήματα και ένα από αυτά, τα *Phaenomena*, προκύπτει και αποτελεί μίμηση του πεζού έργου του Εύδοξου γύρω από την αστρονομία. Η πιθανής απουσία της εμπειρίας του

Αράτου γίνεται φανερή μέσα από τα σχόλια του Ίππαρχου ο οποίος επισημαίνει διορθώσεις στο έργο *Phaenomena* και αποδίδει τα λάθη σε μειωμένη αντίληψη της πηγής του Αράτου. Υπάρχει ακόμη η άποψη ότι ο Νίκανδρος αποτέλεσε μέρος μιας αριστοκρατικής σειράς ειδικών σε θέματα δηλητηριάσεων και αντιδοτων (θηριακοί) επί της δυναστείας των Ατταλιδών της Περγάμου, όπου είτε λειτούργησε ο ίδιος ως ιατρός είτε συνάντησε και εμπνεύστηκε από ιατρούς. Στη μετέπειτα παράδοση ο Νίκανδρος εμφανίζεται σε αρκετά επιγράμματα του ένατου βιβλίου της Ελληνικής Ανθολογίας (*Greek Anthology*). Εκεί ο Νίκανδρος περιγράφεται ως ειδικός, ισάξιος των μυθικών θεραπευτών όπως ο Παιώνας, ο Χείρων, ο Ασκληπιός, και ο Ιπποκράτης. Τα επιγράμματα αυτά μαρτυρούν πως ο Νίκανδρος αποτέλεσε σημαντική πηγή γνώσης για τους μεταγενέστερους θεραπευτές^{16 17}.

Έχει διατυπωθεί ακόμη η άποψη ότι υπάρχουν δύο ποιητές της αρχαιότητας με το όνομα Νίκανδρος ο Κολοφώνιος. Ο παλαιότερος έζησε στο μέσο του 3^{ου} αιώνα π.Χ. ενώ ο νεότερος έζησε στα χρόνια της βασιλείας του Αττάλου Γ' (Attalus III) (138-133 π.Χ.). Μάλιστα πιστεύεται ότι ο παλαιότερος ήταν υιός του Αναξαγόρα και τα έργα που αφορούν ιστορία της αρχαιότητας και γεωγραφία όπως *Thebaica*, *Sicilia* κ.τ.λ. είναι δικά του. Ο νεότερος Νίκανδρος, υιός του Δαμαίου, είναι αυτός που έγραψε τα *Θηριακά* και τα *Αλεξιφάρμακα*. Το αν υπήρξαν δύο ποιητές με το ίδιο όνομα και το σε ποιόν ανήκει ποιο έργο δεν είναι ακόμη ξεκάθαρο^{16 17}.



Εικόνα 11. Εικόνες από κώδικες των έργων *Θηριακά* και *Αλεξιφάρμακα*, Εθνική Βιβλιοθήκη της Γαλλίας, Παρίσι.

Ως ιατρός θεωρείται ότι ακολούθησε την εμπειρική σχολή του Φιλίνιου της Κω¹⁸ (Philius of Cos) και του Σεραπίωνος της Αλεξάνδρειας (Serapion of Alexandria). Κύρια πηγή των ιατρικών του πληροφοριών αποτέλεσε ο ιατρός Απολλόδωρος της Αιγύπτου (Apollodorus of Egypt). Και τα δύο διασωθέντα έργα του Νικάνδρου φέρουν στοιχεία από τα δύο έργα του Απολλόδωρου (από την Αλεξάνδρεια) της Αιγύπτου ο οποίος έζησε στις αρχές του 3^{ου} αιώνα π.Χ. (290 π.Χ.) και ο ίδιος με τη σειρά του φαίνεται να έχει πάρει στοιχεία από το έργο *Ριζοτομικόν* του Διοκλή του

Καρύστιου (375-295 π.Χ.). Ο Απολλόδωρος, όπως έχει αναφερθεί ανωτέρω, συνέταξε πραγματείες, μη διασωσμένες, σχετικά με δηλητηριώδη ζώα και φάρμακα: *Περί θηρίων* (*Peri therion*) (On Poisonous Animals) και *Περί Θανάσιμων Φαρμάκων* (*Peri thanasimon pharmakon*) (On Poisonous Drugs) τα οποία αποτέλεσαν επίσης την κύρια πηγή των μεταγενέστερων φαρμακολόγων (Διοσκουρίδης)¹⁹. Ο Νικάνδρος αξίζει να σημειωθεί ότι εισήγαγε πρώτος την ιατρική χρήση της βδέλλας (*Θηριακά*). Η κοινή μέθοδος της φλεβοτομίας διατηρήθηκε μέχρι τον 19^ο αιώνα.

Ο Νικάνδρος επηρέασε ρητορικά, τοξικολογικά και θεραπευτικά τους μεταγενέστερους. Η φήμη του τόσο ως ιατρός όσο και ως ποιητής ήταν ιδιαίτερα εξαπλωμένη κατά τη διάρκεια των αρχαίων χρόνων και παρέμεινε μέχρι την Αναγέννηση. Τα έργα του επηρέασαν την ελληνική και λατινική λογοτεχνία, επαινέθηκαν από τον Κικέρωνα (*De oratore*), έγιναν αντικείμενο μίμησης του Οβιδίου και του Λουκανού, ενώ χρησίμευσαν συχνά ως πηγές για τον Πλίνιο, τον Ερωτιανό, τον Αιλιανό και άλλους συγγραφείς. Ο Διοσκουρίδης αναφέρει απόψεις του Νικάνδρου σε δύο σημεία (3.29 και 4.99) στο έργο του *Περί Ιατρικής Ύλης*. Ο Γαληνός, στα φαρμακολογικά του έργα, κάνει πολλές φορές αναφορά σε στίχους του Νικάνδρου. Οι πρώτες τυπωμένες μορφές των *Θηριακών* και *Αλεξιφάρμακων* εμφανίστηκαν από κοινού στη Βενετία το 1499.



Εικόνα 12. Εικόνες από κώδικες των έργων *Θηριακά* και *Αλεξιφάρμακα*, Εθνική Βιβλιοθήκη της Γαλλίας, Παρίσι.

Τα *Αλεξιφάρμακα* αποτελούνται από 630 στίχους όπου περιγράφονται 21 δηλητήρια από του στόματος (σε αντίθεση με τα *Θηριακά* όπου το δηλητήριο απορροφάται από το δέρμα) πάσης φύσεως: ζωικής, φυτικής και ανόργανα στοιχεία (ορυκτά). Μελετώνται βάσει της εκλεκτικότητας των τοξικών συμπτωμάτων, και εν συνεχεία των θεραπευτικών τους συνταγών. Τα *Αλεξιφάρμακα* είναι καλώς δομημένα καθώς υπάρχει συστηματική, διαχωρισμένη σε τρία μέρη εισαγωγή στο κάθε δηλητήριο: φυσική περιγραφή του διαλύματος στο οποίο αναμείχθηκε το δηλητήριο, τα συμπτώματα που προκύπτουν από τη δηλητηρίαση και μια λίστα ειδικών

συνταγών. Σε πολλά σημεία προτείνεται η χρήση του ελαιολάδου ως εμετικό για τη θεραπεία της δηλητηρίασης. Σημαντικό μέρος αυτού του έργου βρίσκεται σήμερα στη Μονή Ιβήρων στο Άγιο Όρος.

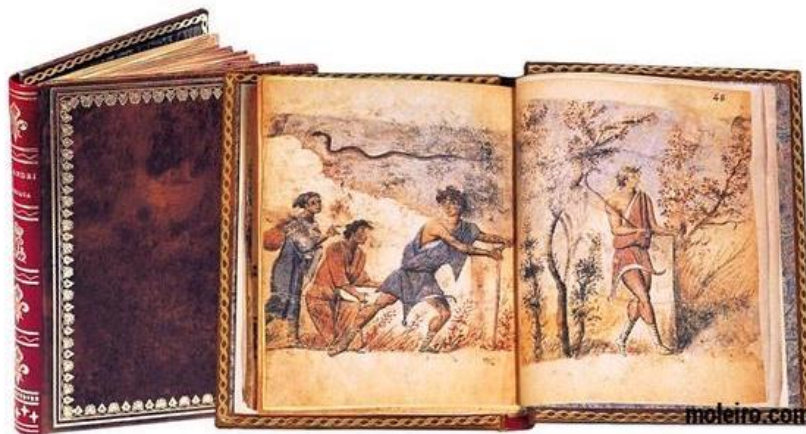
Το μεγαλύτερο σε έκταση διασωθέν έργο του Νικάνδρου είναι τα *Θηριακά* το οποίο αποτελεί αρχαίο διδακτικό ποιήμα 958 στίχων γραμμένων σε δακτυλικό εξάμετρο²⁰. Σε αυτό αναφέρονται η φύση δηλητηριωδών οργανισμών (14 είδη ιοβόλων ερπετών), τα συμπτώματα από δήγματα αυτών και η θεραπεία τους (143 φυτά).



Εικόνα 13. Εικόνες από κώδικες των έργων *Θηριακά* και *Αλεξιφάρμακα*, Εθνική Βιβλιοθήκη της Γαλλίας, Παρίσι.

Και στα δύο έργα του Νικάνδρου απουσιάζει η γραφική απεικόνιση των φυτών ή των ερπετών. Τα *Θηριακά* και τα *Αλεξιφάρμακα* έχουν κοινά χαρακτηριστικά, καθώς και στα δύο ποιήματα ο Νικάνδρος απευθύνεται σε κάποιο πρόσωπο, στον Ερμησιάνακτα και στον Πρωταγόρα αντίστοιχα, έχουν κοινή θεματολογία γύρω από τοξικούς παράγοντες και κλείνουν με τη "σφραγίδα" του ποιητή ο οποίος υπογράφει έτσι το ποιητικό του έργο. Επίσης ο τρόπος γραφής του Νικάνδρου, όσον αφορά τη σύνταξη και το λεξιλόγιο του, τα οποία είναι πολλές φορές τεχνητά, επιτηδευμένα σκοτεινά, υπεφορτωμένα, με πεσιμιστικό ύφος και ομηρίζουσα γλώσσα (πιθανώς λόγω κοινής καταγωγής με Όμηρο), έχει αποτελέσει εμπόδιο στην μελέτη και ανάλυση των όσων περιγράφει και εκεί ακριβώς αποδίδεται η περιορισμένη απήχηση των έργων του. Μια προσπάθεια μετάφρασης-παράφρασης των *Θηριακών* και των *Αλεξιφάρμακων* πραγματοποιήθηκε από τον Ευκτένιο, μετά το 2^ο αιώνα μ.Χ., ο οποίος πιθανολογείται ότι ήταν μοναχός της εποχής εκείνης. Παρ'όλα αυτά η απόδοση του κειμένου δεν μπορεί να θεωρηθεί πλήρης. Τα έργα του Ευτέκνιου συμπεριλαμβάνονται σε ένα από τα πιο διάσημα Βυζαντινά επιστημονικά χειρόγραφα, το εικονογραφημένο βιβλίο "Vienna Dioscurides", το οποίο συντάχθηκε στην Κωνσταντινούπολη το 512-13 μ.Χ. Η πεζή παράφραση του Ευτέκνιου εμφανίζεται εικονογραφημένη με σχέδια όψεων, αραχνών, εντόμων κ.τ.λ. Οι ίδιες εικόνες

επανεμφανίζονται τον 10^ο αιώνα μ.Χ. σε μία αντιγραφή του προαναφερθέντος συγγράματος, αυτή τη φορά σε βιβλιοθήκη της Νέας Υόρκης. Τον ίδιο αιώνα ένα σημαντικό εικονογραφημένο χειρόγραφο των δύο ποιημάτων του Νικάνδρου συντάσσεται στο Παρίσι. Αυτό περιέχει εικόνες όχι μόνο των φιδιών, σκορπιών και φυτών που αναφέρει ο Νίκανδρος, αλλά και ανθρώπινες φιγούρες που επιδεικνύουν τις επιδράσεις των δηλητηριωδών ουσιών ή εικονογραφημένες τις μυθολογικές αναφορές του Νικάνδρου. Επίσης τον 13^ο αιώνα ο Μάξιμος Πλανούδης (Βυζαντινός, λόγιος μοναχός) επιδεικνύει ενδιαφέρον για τον Νίκανδρο, συγγράφοντας ένα χειρόγραφο (Florence, Biblioteca Medicea-Laurenziana) το οποίο εμπεριέχει και τα δύο ποιήματα. Τα σχόλια, οι παραφράσεις και οι εικονογραφήσεις αποτελούν στοιχεία του αδιάκοπου ενδιαφέροντος των μεταγενέστερων να διατηρήσουν το Νίκανδρο στην πνευματικά ανώτερη τάξη της ελληνιστικής και βυζαντινής περιόδου αλλά και του ενθουσιασμού τους ως προς το αμάλγαμα επιστήμης, παράδοσης, μύθου, ποίησης και μαγείας, το οποίο είναι χαρακτηριστικό στις περισσότερες αρχαίες ελληνικές τοξικολογικές πρακτικές. Έτσι λοιπόν μέχρι και τον 16^ο αιώνα συναντώνται τυπωμένες εκδόσεις, διάφορες μεταφράσεις στη λατινική γλώσσα, συμπεριλαμβανομένης μιας σε επικό έμμετρο λόγο και μια ποιητική μετάφραση στα γαλλικά οι οποίες έχουν εκδοθεί. Σαφώς η συγγραφική δεξιοτεχνία του Νικάνδρου αποτελεί αντικείμενο μελέτης μέχρι σήμερα.¹⁴



Εικόνα 14. Θηριακά - Επανατύπωση χειρογράφου του 10^{ου} αιώνα

Αναλυτικότερα, στο κείμενο των *Θηριακών* περιγράφονται τα είδη των ερπετών και των φαλαγγίων, οι βλάβες που προκαλούν στους ανθρώπους, τα θεραπευτικά βότανα και η χρήση τους ως προστατευτικά θυμιάματα, υποστρώματα, σε αλοιφές ή και αντίδοτα για την περιποίηση του δήγματος (με αντιστοίχιση σε πληγές που προκαλούνται από διάφορα θηρία). Αναφέρονται επίσης σύνθετα σκευάσματα καθώς και ζωικής προέλευσης ή άλλες δρόγες.

Η δομή των *Θηριακών* είναι η εξής^{21 22}:

I. Προοίμιο (σσχ. 1-20)

- Εισαγωγή, πρόσωπο στο οποίο απευθύνεται το ποιήμα (σσχ. 1-7)
- Μυθολογική μετάβαση (σσχ. 8-20)

Το προοίμιο (σσχ. 1-20) αποτελείται από την εισαγωγή (σσχ. 1-7) όπου παρουσιάζεται το θέμα, η χρησιμότητα του έργου για τους ανθρώπους που εργάζονται στην ύπαιθρο (π.χ. γεωργοί, υλοτόμοι κ.ά.) και ο αποδέκτης του ποιήματος, ο οποίος είναι ο Ερμησιάνακτας. Το "Ερμησιάναξ" ήταν ένα κοινό όνομα στην Ελληνιστική εποχή. Πιθανολογείται ότι αναφέρεται όχι μόνο σε δύο σημαντικούς προκάτοχους της ελληνιστικής ποίησης, αλλά και σε δύο σημαντικούς συμπολίτες του Νικάνδρου από την πόλη Κολοφώνα¹⁷. Ακολουθεί η μυθολογική μετάβαση (σσχ 8-20), όπου αναφέρονται συνοπτικά η γέννηση των ιοβόλων ερπετών από το αίμα των Τιτάνων και η ύβρις του Ωρίωνα.

II. Γενικές Προφυλάξεις (σσχ. 21-156)

- Σημεία που προτιμούν τα οφιοειδή και θα πρέπει να αποφεύγει ο αναγνώστης όταν κοιμάται στην ύπαιθρο (σσχ. 21-34)
- Δημιουργία απωθητικής οσμής με χρήση θυμιάματος (σσχ. 35-56)
- Δημιουργία απωθητικής οσμής με χρήση βοτάνων τα οποία έχουν έντονο άρωμα (σσχ. 57-79)
- Παρασκευή απωθητικών αλοιφών (σσχ. 80-97)
- Παρασκευή απωθητικής αλοιφής ζωικής προέλευσης (σσχ. 98-114)
- Τρόποι αποφυγής επιθέσεων οφιοειδών σε περίπτωση αιφνιδιασμού (σσχ. 115-156)

Στις γενικές προφυλάξεις (σσχ. 21-156) αναφέρονται οι διάφορες τοποθεσίες όπου είναι πιθανό να συναντήσει κανείς φίδια (σσχ. 21-34). Στη συνέχεια περιγράφεται η παρασκευή απωθητικών οσμών με τη χρήση θυμιαμάτων (σσχ.35-56), από υλικά όπως κέρατο από ελάφι, γαγάτη (λίθος), βλάχνον, κάρδαμο, μελάνθιο μαζί με θειάφι, θράκιο λίθο, χαλβάνη, άκηστι, κέδρο, ή με τη χρήση αρωματικών φυτών (σσχ. 57-79) όπως καλάμινθος ή καλαμινθίνη, λύγος, πόλιον, έχιον, αγριοθύμαρο, ορίγανον, αβρότονον, κόνυζα, αζόγουρο, σπαθόχορτα, ασφόδελος, στρύχνος, πευκέδανον καθώς και η παρασκευή τεσσάρων απωθητικών αλοιφών στις οποίες συστατικά είναι τα εξής: κέδρος, πευκέδανον, πολυγόνατο, κόνυζα, σίλφιον, ελελίσφακος, άγρια νερομολόχα, αβρότονο, κάρδαμο, δαύκη ενώ άλλη μια αλοιφή παρασκευάζεται με χρήση

μυελού ελαφιού, φιδιών κ.ά. (σтч. 80-97 και σтч. 98-114). Τέλος δίνονται συμβουλές για τη αποφυγή επιθέσεων από ερπετά (σтч. 115-156), επισημαίνοντας ότι τα θηλυκά φίδια είναι πιο επικίνδυνα από τα αρσενικά, ορίζοντας τις χρονικές περιόδους (π.χ. καλοκαίρι) και τις τοποθεσίες (π.χ. τα απόκρημνα βράχια του όρους Όρθρος) στις οποίες πρέπει κανείς να βρίσκεται σε επιφυλακή.

III. Μέρος 1α: Είδη φιδιών (σтч. 157-492)

Στους στίχους αυτούς γίνεται μια εκτενής περιγραφή των διαφόρων ειδών φιδιών αλλά και των πληγών που προκαλεί το δήγμα τους. Μερικά από τα είδη που αναφέρονται είναι η αιγυπτιακή κόμπρα (*Naja haje*), η οχιά (*Viper ammodytes*), ο κεραστής (*Ceraster ceraster*) και η διψάς (*Pseudocerastes persicus*). Επιπλέον αναφέρονται και είδη που ανήκουν στη σφαίρα του μύθου, όπως ο βασιλίσκος. Τέλος επισημαίνεται ότι όλα τα ερπετά δεν είναι επικίνδυνα και δηλητηριώδη. Πιο συγκεκριμένα η αναφορά γίνεται με την εξής σειρά:

- Η ασπίς Φοινήεσσα (κόμπρα) (σтч. 157–189)
- Ο ιχνεύμονας και η ασπίς (σтч. 190-208)
- Η οχιά (σтч. 209-257)
- Ο κεραστής (σтч. 258-281)
- Ο αιμόρρους (σтч. 282-319)
- Η σηπεδόνα (σтч. 320-333)
- Η διψάς (σтч. 334-358)
- Ο χέρσουδρος (σтч.359-371)
- Η αμφίσβαινα (σтч. 372-383)
- Η σκυτάλη (σтч. 384-395)
- Ο βασιλίσκος (ο βασιλιάς των ερπετών) (σтч. 396-410)
- Ο δρυΐνας-χέλυδρος(σтч. 411-437)
- Ο δράκοντας (του Ασκληπιού) (σтч. 438-447)
- Ο δράκοντας και ο βασιλιάς των πτηνών (αετός) (σтч. 448-457)
- Ο κεχρίνας (κεγχρίνης) (σтч. 458-482)
- Ο ασκλαβώτης (σтч. 483-487)
- Μη βλαβερά ερπετά (σтч. 488-492)



Εικόνα 15. Εικόνες από κώδικες των έργων Θηριακά και Αλεξιφάρμακα, Εθνική Βιβλιοθήκη της Γαλλίας, Παρίσι.

IV. Μέρος 1β: Φαρμακευτικά φυτά για τα δήγματα από τα ιοβόλα ερπετά

Συνταγές ι (σтч. 493-714)

Το πρώτο κομμάτι των συνταγών περιλαμβάνει μια πληθώρα παρασκευασμάτων δραστικών έναντι των δηγμάτων των φιδιών. Οι συνταγές μπορεί να είναι απλές, αποτελούμενες από ένα φυτό ή πιο σύνθετα μείγματα όπου γίνεται συνδυασμός υλικών. Κάθε επιμέρους τμήμα ξεκινά με την περιγραφή του φυτού, σε αρκετές περιπτώσεις επικεντρώνεται στο τμήμα του βοτάνου που αποτελεί τη δρόγη, τις ποσότητες που πρέπει να χρησιμοποιηθούν από το κάθε υλικό καθώς και τον κατάλληλο διαλύτη (π.χ. νερό, ξύδι, οίνο), τον τρόπο παρασκευής-ανάμειξης ενώ κλείνει με την οδό χορήγησης. Αναφέρονται σύνθετα σκευάσματα που περιέχουν ζωικές δρόγες ή ορυκτά συστατικά.

Τα επιμέρους τμήματα είναι:

- Δεύτερο προοίμιο (σтч. 493–496)
- Γενική συμβουλή: χρήση φρεσκοκομμένων βοτάνων (σтч. 497–499)
- Χείρωνος ρίζα (σтч. 500–508)
- Αριστολόχεια (σтч. 509–519)
- Τρίσφυλλον (σтч. 520-527)

Σύνθετα θεραπευτικά σκευάσματα με φυτικές δρόγες:

- Θάψου ρίζα, άγνος, νήρις, πηγάνιον, θύμβρη – θύμβρα (σтч. 528–533)
- Ασφόδελος, ελξίνη-κλύβατις (σтч. 534–540)
- Έχιος Αλκιβίου ρίζα (σтч. 541–549)
- Πράσιον-μελίφυλλον-μελίκταινα (σтч. 550-556)

Σύνθετα θεραπευτικά σκευάσματα με φυτικές ή/και ζωικές δρόγες:

- Εγκέφαλος όρνιθας, πολύκνημον, ορίγανον, συκώτι αγριόχοιρου (συχ. 557–563)
- Κυπαρίσσου φόβη, πάνακες Χειρώνιον, όρχις κάστορα, όρχις υποπόταμου (συχ. 564–573)
- Αβρότονον, δάφνη, αμάρακος, το πρώτο γάλα ζώου, μέρη από ζώα (συχ. 574–582)
- Πόλιον, κέδρος-αρκευθίς (καρποί κέδρου), πλάτανος-πλατάνου σφαιρίδια, βούπλευρος-σπέρματα βουπλεύρου, Ιδαία κυπάρισσος (συχ. 583–587)
- Κολλυβάτεια-ελξίνη-κλύβατις, πτισάνη (αφέψημα αποφλοιωμένου κριθαριού), ελαιόλαδο (συχ. 588-593)
- Πίσσα ευώδεα [ελαιώδες αρωματικό έκκριμα που παράγεται από δέντρο του γένους *Betula* ή το πεύκο (ξυλόπισσα)], νάρθηκος χλοερού ήτρον-νάρθηξ, κεδρίδες (βλ. αρκευθίς), σελίνου σπέρματα, υπείου μαράθου ρίζα (υπομάραθον), υπείου σελίνου σπερμεία-σέλινον, σμύρνα (ρητήνη μύρου, μύρο βαλσαμόδενδρου), κυμίνου καρπός (κύμινον) (συχ. 594–603)
- Νάρδος, γάλα, καβούρι, ίρις, ερείκη, μυρίκη, κόνυζα, ακτή, σάμψυχον, κύτισος, τιθύμαλλος (συχ. 604–619)
- Βραστοί βάτραχοι, ήπαρ φιδιού, κεφάλι φιδιού (συχ. 620–624)
- Ελίχρυσος, κόρκορος, κονίλη, όνου πετάλειον, θύμβρη (συχ. 625–629)
- Ράμνος (συχ. 630–635)
- Δύο είδη έχιον (*Echium plantagineum* L., *Echium vulgare* L.) (συχ. 636–644)
- Ηρύγγιο ρίζεα, ακάνθου ρίζεα, όρειον, σέλινον Νεμεαίον, άνησσον (συχ. 645–655)
- Χαμαίλεων αιγλήεις (φύλλα, φλοιός ρίζης), χαμαίλεων ορφνός (συχ. 656–665)
- Αλκίβιος (συχ. 666–675)
- Κρότων, ηλιοτρόπιον το μέγα, ηλιοτρόπιον το μικρόν, κοτυληδών, πυρίτις, σκολοπένδρειον, πάνακες Φλεγυήιον (συχ. 676–688)
- Αποξηραμένη σάρκα κουναβιού (συχ. 689–699)
- Αίμα θαλάσσιας χελώνας, κύμινον αγρότερον, κολάστρα από λαγό (συχ. 700–714)

V. Μέρος 2α: Φαλάγγια και άλλα είδη δηλητηριωδών ζώων (συχ. 715-836)

Το επόμενο κομμάτι του ποιήματος (συχ. 715-836) αφορά τα υπόλοιπα δηλητηριώδη ζώα όπως τις αράχνες και τους σκορπιούς, και σε αντιστοιχία με το παραπάνω κομμάτι των

οφιοειδών γίνεται η περιγραφή τόσο των διαφόρων ζωικών ειδών όσο και των πληγών που αυτά προκαλούν. Πιο αναλυτικά:

- Αράχνες (σтч. 715-768)
 - Ο σκουρόχρωμος ρώξ (σтч. 715-724)
 - Το αστέριον (σтч. 725-728)
 - Το κυάνεον (σтч. 729-733)
 - Ο αγρώστης (σтч. 734-737)
 - Το δύσδηρι (το σφήκειον) (σтч. 738-746)
 - Το μυρμήκειον (σтч. 747-751)
 - Αράχνες που μοιάζουν με σκαραβαίους (σтч. 752-758)
- Ζωύφια που μοιάζουν με τη νυχτοπεταλούδα (κεφαλοκρούστης, κρανοκολάπτης, cranocolaptes) (σтч. 759-768)
- Σκορπιοί (σтч. 769-804)
 - Ο λευκός σκορπιός (σтч. 769-771)
 - Ο σκορπιός που έχει το χρώμα της φωτιάς (σтч. 772-774)
 - Ο σκουρόχρωμος σκορπιός (σтч. 775-776)
 - Ο υποκίτρινος σκορπιός (σтч. 777-781)
 - Ο ωχρός σκορπιός (σтч. 782-785)
 - Δύο είδη σκορπιών που μοιάζουν με καβούρια (σтч. 786-796)
 - Ο μελίχλωρος σκορπιός (σтч. 797-798)
 - Ο "πύρινος", κόκκινος σκορπιός (σтч. 799-804)
- Διάφοροι επικίνδυνοι οργανισμοί (σтч. 805-836)
 - Δύο είδη μελισσών (σέρσεκας, ίουλος) (σтч. 805-810)
 - Μυριάποδα, δύο είδη σφήκας, σαρανταποδαρούσα, μυγαλή, σήψ, σαλαμάνδρα (σтч. 811-821)
- Θαλάσσια ζώα, μύραινα, τρυγών (σтч. 822-836)

VI. Μέρος 2β: Φάρμακα για τα δήγματα από τα φαλάγγια και τα λοιπά κέντρω αμυνόμενα ζώα - Συνταγές ii (σтч. 837-956)

Το δεύτερο κομμάτι των συνταγών είναι σαφώς μικρότερο από το πρώτο και χωρίζεται στις εξής τρεις ενότητες: μεμονωμένες συνταγές για την αντιμετώπιση διαφόρων καταστάσεων που προκαλούνται από δήγματα, περιποίηση των πληγών και τέλος γενική συνταγή η οποία

αναφέρεται ως πανάκεια σε δηλητηριώδη δήγματα. Σε αυτά τα σημεία περιγράφονται οι δρόγες που φαίνεται να έχουν αποτέλεσμα στη θεραπεία του νυγμού διαφόρων φαλαγγίων, καθώς και ο τρόπος χορήγησης ή παρασκευής των αντίστοιχων σκευασμάτων.

Εισαγωγική μετάβαση (σтч. 837)

Μεμονωμένες συνταγές (σтч. 838-914)

- Αγχούσης χαίτη, πενταπέτηλον, βάτου άνθεα φοινά, άρκτιον, οξαλίσ, λυκαψός, κίκκαμα, τóρδειλον, πίτυς χαμηλή, φηγού φλοιός, καυκαλίσ, σταφυλίνοσ, τρεμίθου σπέρματα, φύκοσ, αδιάντον (σтч. 838-847)
- Σμυρνείον, λευκάδοσ ρίζα, ηρύγγου ρίζα, λιβανωτίδοσ καχρυφόρου ρίζα, απαρίνη, κολλυβάτεια (ελξίνη – κλύβατισ), μήκων θυλακίσ, μήκων επιτηλίσ (σтч. 848-852)
- Κράδοσ κυέουσα κορύνη, ερινάδοσ κόκκυγασ (καρπόσ αγριοσυκιάσ) (σтч. 853-855)
- Πυράκανθα, φλόμου αργέοσ άνθη, αιγίλοποσ πέτηλα, χελιδονίου πέτηλα, δαύκειον, βρυωνίδοσ ρίζα (σтч. 856-859)
- Περιστερεόνοσ πέτηλα, ράμνοσ (σтч. 860–862)
- Παρθένιον, κόρκορον, πεταλίτισ (σтч. 863–865)
- Συκίου αγροτέρου ρίζα, παλιούρου καρπόσ και χαίτη, σίδησ νεαλείσ ορόβακχοι, ύσσωποσ, όνωνισ, τηλέφιλον, κλήμα νέον εν βότρυσι, αγλίθεσ, κορίοιο ορειγενέοσ καρπόσ, κονύζησ πολύχνοα φύλλα (σтч. 866–875)
- Πέπερισ, κάρδαμον από Μήδων, γλήχων, στρύχνοσ, σίνηπι (σтч. 876–878)
- Πράσον χλοερόν, κνίδησ σπέρμα, σκίλλησ νιφόεν κάρη αυά τε σπείρεα βολβών, δράκοντοσ καυλείον, ράμνου ασπαράγουσ, πεύκη αγροτέρα (πεύκησ αγροτέρασ σπόρια) (σтч. 879–884)
- Σκορπίον, σκορπιοειδέσ, σίδη, πιστάκιον (καρπόσ πιστακιάσ), μύρτον, ορμίνιο κάρφεα, μάραθον, ειρύσιμον, ερεβίνθου αγροτέρου σπερμεία (σтч. 885–895)
- Σίσυμβρον, μελιλλώτου νέον στέφοσ, οινάνθη, λυχνίσ, θρυαλλίσ, ρόδον, ίον (σтч. 896–900)
- Πουλύγονον ιάμνοουσ, ψίλωθρον, υακίνθου καρπόν (σтч. 901–906)
- Τριπέτηλον, οποίο δάκρυα, έρφυλλοσ, κρήθμον, κυπάρισσοσ ποίη, άννησον, Λιβυκή ρίζα (σтч. 907–914)

Αντιμετώπιση πληγών (σσχ. 915-933)

- Γενική συνταγή σε περίπτωση έκτακτης ανάγκης (σσχ. 915–920)
- Απομάκρυνση δηλητηρίου, καυτηριασμός, ιαματική αλοιφή (σσχ. 921–933)

Γενική συνταγή (σσχ. 934-956)

Αριστολόχεια, ίριδος ρίζα, νάρδου ρίζα, χαλβανίδες ρίζαι, πύρεθρον, δαύκειον, βρυωνίδος ρίζα (βρυώνη, βρυωνίς), ρίζα γλυκουσίδης, ελλεβόρου μελανόχροος κάρφεια, αφρός νίτρου (ανόργανα και ορυκτά φάρμακα), κύμινα (καρπός ήμερου, κονύζης βλαστός, σταφίς αγροτέρα, δάφνης σπερμεία, κύτισος, υπείος λειχήν, κυκλάμινος, μήκωνος οπός, άγνου σπέρματα, βάλσαμον, κίναμον, σφονδύλειον, αλάτι, πυτιά (κολάστρα), καβούρι, απαρίνης χυλός

VII. Επίλογος: Σφραγίδα του Νικάνδρου (σσχ. 957-958)

Το τελευταίο κομμάτι των *Θηριακών* είναι ο επίλογος οποίος αποτελεί τη σφραγίδα του ποιητή. Η μορφή και η μικρή του έκταση, με μόλις δυο στίχους, είναι παρόμοια με τον επίλογο του δεύτερου έργου του Νικάνδρου, τα *Αλεξιφάρμακα*.

*" Τον Όμηρο θα θυμάσαι Ερμησιάνακτα, αν βρεις απ' αυτά
θεραπείες και γιατρείες, και τον Νίκανδρο, που η χιονόλευκη
πολίχνη της Κλάρου ανάθρεψε κι ανάστησε. "*

Κατά μια προσέγγιση ανάμεσα στα αντίδοτα κατά των όφρων του Νικάνδρου, υπάρχουν αρκετά διαφορετικά φυτά ή φυτικά παράγωγα ενώ μόνο δέκα ζωικά προϊόντα προτείνονται και ένα ανόργανο προϊόν (αλάτι) συμπεριλαμβάνεται. Από τις φυτικές δρόγες, οι περισσότερες αναφέρονται μία μόνο φορά, με εξαίρεση τη μαντζουράνα (5 επισημάνσεις), το βούγλωσσο (4 επισημάνσεις) και τις 2 επισημάνσεις για τη σατουρέγια, το κύμινο, την ελξίνη, το κυπαρίσσι, τον κέδρο κ.ά. Ανάμεσα στα ζωικά προϊόντα, μόνο ένα από τα δέκα αναφέρεται πάνω από μια φορές (*tamisos*, 2 επισημάνσεις), ενώ το άλας εμφανίζεται μόνο κατά την προετοιμασία του δέρματος της αλεπούς. Το βασικό μέσο διάλυσης του Νικάνδρου είναι το κρασί, ακολουθούμενο από το ξύδι, το νερό και το ελαιόλαδο. Τα προφυλακτικά μέτρα υποδεικνύουν 27 φυτά, 4 ζωικά προϊόντα και 2 ανόργανα υλικά. Εννέα από τα φυτά τα οποία επισημαίνονται στις συμβουλές πρόληψης (κέδρος, κύμινο, τεύκριο, βούγλωσσο, μαντζουράνα, αψιθιά, λύγος, καρποί κέδρου και ασφόδελος) επανεμφανίζονται και ως αντίδοτα, κάτι που δεν συμβαίνει με κανένα από τα ζωικά παράγωγα²³.

Το 2014 ολοκληρώθηκε η πρώτη ακριβής μετάφραση των *Θηριακών* στην νέα ελληνική γλώσσα από τη φιλόλογο κυρία Βασιλική Δεδούση, με βάση την οποία πραγματοποιήθηκε η παρούσα μελέτη. Το αρχαίο κείμενο των *Θηριακών* το οποίο μεταφράστηκε είναι του Otto Schneider: *Nicander "Theriaca"–The Text* (1856). Συγκεκριμένα το βιβλίο "*Nicadrea*", Ο. Schneider αποτέλεσε το πρώτο αποδεκτό αντίγραφο των διασωθέντων έργων-ποιημάτων του Νικάνδρου. Είναι επίσης και το τελευταίο καθώς δεν έχει δημοσιευθεί κάτι άλλο από το 1856. Οι κώδικες που χρησιμοποιήθηκαν από τον Schneider ήταν οι *Parisinus Suppl. 247, s. x vel xi*. Πέραν αυτών ο Schneider έκανε χρήση και των ακόλουθων συγγραμμάτων:

- A. Monacensis 494, s. xv vel xvi.
- B. Leidensis 39, s. xv.
- G. Goettingensis, Philologus 29, s. xiii.
- H. Vaticano - Palatinus 139, s. xv vel xvi.
- K. Vaticanus 305, s. xiii.
- L. Lorrianus. (an unidentified ms)
- M. Laurentianus xxxii. 16, A.D. 1280.
- P. Parisinus Reg. 2728, s. xv.
- R. Riccardianus 18 (now 56), s. xv.
- V. Venetus Marcianus 480, s. xv.
- p. Parisinus 2403, s. xiii.
- v. Venetus Marcianus 477, s. xv.

2.3 Πεδάνιος Διοσκουρίδης - Περί Ιατρικής Ύλης



Εικόνα 16. Διοσκουρίδης, Περί Ιατρικής Ύλης, Ισπανία, 12^{ος} - 13^{ος} αιώνες μ.Χ.

Ο Διοσκουρίδης έχει τα προσωνύμια Αναζαρβεύς, που επέλεξε ο ίδιος, για να τιμήσει τον τόπο καταγωγής της μητέρας του και πιθανόν του ίδιου, την Ανάζαρβα της Κιλικίας (Β. Τουρκία)

και Πεδάνιος που το απέκτησε, όταν υιοθετήθηκε σε μεγάλη ηλικία από Ρωμαίο της οικογένειας των Πεδανίων, για να αποκτήσει δικαιώματα Ρωμαίου πολίτη. Ονομάσθηκε επίσης Πεδάνιος για να διακρίνεται τόσο από τον ποιητή Διοσκουρίδη όσο και από τον ιστορικό Διοσκουρίδη. Ωστόσο, ο Γαληνός της Περγάμου αναφέρει ότι ο Διοσκουρίδης καταγόταν από την Ταρσό, αφού τον αποκαλεί Διοσκουρίδης ο *Ταρσεύς*. Δυστυχώς, δεν έχουν διασωθεί μαρτυρίες από άλλες πηγές και οι ελάχιστες πληροφορίες γύρω από το πρόσωπό του αντλούνται από το ίδιο του το έργο και κυρίως από το προοίμιο του *Περί Ιατρικής Ύλης*. Επίσης δεν είναι γνωστό το ακριβές έτος γέννησής του αν και εκτιμάται στις αρχές του 1^{ου} αιώνα μ.Χ.. Ο Διοσκουρίδης είχε ιδιαίτερη κλίση στη μελέτη των φυτών και των βοτάνων από νεαρή ηλικία. Σπούδασε ιατρικές επιστήμες στην Ταρσό κοντά στον Άρειο της Ασκληπείαδας Σχολής, τόπο που αποτελούσε το διασημότερο βοτανολογικό και φαρμακολογικό κέντρο της εποχής, και κατόπιν επιδόθηκε στην έρευνα των φαρμακολογικών ιδιοτήτων πολλών βοτάνων. Υπάρχουν ακόμη αναφορές που περιγράφουν την Αλεξάνδρεια ως τον τόπο που σπούδασε ο Διοσκουρίδης. Ο ίδιος ήταν ιατρός του Ρωμαϊκού στρατού επί της αυτοκρατορίας των Κλαυδίου (41 μ.Χ.-54 μ.Χ.) και Νέρωνος (54 μ.Χ.-68 μ.Χ.). Με την ιδιότητα του στρατιωτικού ιατρού ο Διοσκουρίδης ταξίδεψε σε πολλές ρωμαϊκές επαρχίες της Ανατολής, από την Ελλάδα έως τη Μεσοποταμία και την Αίγυπτο. Επίσης είχε την δυνατότητα να κάνει προσωπικές παρατηρήσεις αναφορικά με τα φαρμακευτικά φυτά, αλλά και να χρησιμοποιήσει τις μέχρι τότε διαδεδομένες γνώσεις σχετικά με τα διάφορα βότανα και κυρίως τα φαρμακευτικά, να διασώσει πολύτιμες πληροφορίες και να περιθάψει τους τραυματίες. Μέσα στα έργα του καταγράφεται όλη η αρχαία φαρμακολογία, βοτανολογία και πρακτική ιατρική, αλλά και πολλά στοιχεία της λαϊκής παράδοσης, των προλήψεων και του καθημερινού βίου της εποχής με έναν ιδιαίτερα άμεσο τρόπο^{24 25 26}.

Το σύγγραμμα *Περί Ιατρικής Ύλης* φαίνεται ότι συντάχθηκε περί το 70-77 μ.Χ. Στο έργο αυτό, το οποίο έγραψε στην ελληνική γλώσσα, είναι αξιοσημείωτο ότι ο Διοσκουρίδης κατόρθωσε, στην εποχή του ακόμη, να αναγνωρίσει 500 φυτά ως θεραπευτικά, από τα περίπου 6.000 είδη που αναγνωρίζουμε σήμερα ως αυτοφυή στην Ελλάδα, δηλαδή πάνω από το 8% (Ε. Μπάουμαν). Είναι σημαντική επίσης η προσπάθεια από τη μεριά του να κατατάξει τα φυτικά είδη με βάση τα βοτανικά χαρακτηριστικά, τις ενεργές ύλες και τις θεραπευτικές ιδιότητές τους. Για κάθε φυτό έδινε τη βοτανική περιγραφή του, τις θεραπευτικές του ιδιότητες και οδηγίες για την παρασκευή των φαρμάκων. Εντυπωσιακή είναι η παράθεση, για πρώτη φορά, των ονομάτων των φυτών και των παρασκευασμάτων σε διαφορετικές γλώσσες καθώς επίσης και με όλες τις τότε γνωστές ονομασίες τους. Με αυτό τον τρόπο διευκολύνθηκαν η συσχέτιση, η ενιαία

ονομασία και η καταγραφή των διαφόρων φαρμακευτικών φυτών. Επίσης έδινε οδηγίες για την αναγνώριση, συλλογή και διατήρηση των φαρμάκων. Αξίζει να αναφερθεί ότι ανάμεσα στα φυτικά είδη περιλαμβάνει και 'εξωτικά' φυτά, δηλ. φυτά που προέρχονται από μακρινές χώρες. Λέγεται ότι τις γνώσεις για αυτά τα φυτά τις απέκτησε κατά τις συνεχείς μετακινήσεις του με το ρωμαϊκό στρατό. Με μοναδικό τρόπο και σύστημα κατέγραψε και περιέλαβε στο βιβλίο του όχι μόνο όλα τα τότε γνωστά φαρμακευτικά φυτά, αλλά και τις οργανικές και ανόργανες φαρμακευτικές ουσίες που συναντώνται στη φύση. Ο Διοσκουρίδης κατέταξε τις ουσίες αυτές όχι αλφαβητικά, όπως συναντάμε αργότερα σε αντίγραφα ή μεταφράσεις του έργου του, αλλά σε κατηγορίες ανάλογα με τα χαρακτηριστικά και τη δραστικότητα τους. Για τις θεραπευτικές ιδιότητες των φυτών (και των άλλων φαρμάκων) ο Διοσκουρίδης φαίνεται να μην παραπέμπει σε κάποιο θεωρητικό σχήμα και η προσέγγισή του θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως εμπειρική. Είναι πιθανόν το βιβλίο αυτό να συγκεντρώνει και να συστηματοποιεί γνώσεις που έρχονται από πολύ παλαιότερα, ακόμα και πριν από τα Ιπποκρατικά κείμενα, μαζί με άλλες νεώτερες, στις οποίες ο συγγραφέας δίνει τη δική του έκφραση. Οι ασθένειες που διακρίνει ο ίδιος φθάνουν συνολικά τις 50 σε αριθμό και ενδεικτικά αναφέρονται κάποιες από αυτές όπως ο πονοκέφαλος, ο ίκτερος, οι παθήσεις της σπλήνας, η νεφρίτιδα, το έλκος του στομάχου. Για καθεμία από αυτές τις ασθένειες προτείνεται μια κατάλληλη συνταγή. Περισσότερα εκ των 65 βοτάνων είναι αντιβηχικά, πολλά αφορούν τη θεραπεία γυναικολογικών παθήσεων, τραυμάτων, οδοντιατρικών και στοματολογικών προβλημάτων ενώ κάποια είναι αντίδοτα στο δηλητήριο των φιδιών. Περιέγραψε επίσης ουσίες που σήμερα είναι γνωστές ως αντισηπτικά, αντιφλεγμονώδη ή αντισυλληπτικά. Το έργο του διαιρείται σε 5 τόμους: 1. αλοιφές, αρώματα, μύρα, βάλασμα, ρητίνες, έλαια, 2. ζώα και ζωικής προέλευσης δρόγες 3. φυτικής προέλευσης δρόγες 4. συνέχεια του τρίτου 5. οίνοι, αλκοολούχα, ορυκτά και ανόργανα φάρμακα. Το Παράρτημα αναφέρεται στα δηλητήρια και τα αντίδοτά τους. Θεωρούσε ότι η ιαματική δύναμη των φαρμάκων προέρχεται από τις τέσσερις θεμελιώδεις ιδιότητες: του θερμού, του ψυχρού, του ξηρού και του υγρού. Ο Διοσκουρίδης αναφέρεται στη συμβολή του φλοιού της ιτιάς για την καταπολέμηση των πονοκεφάλων. Επίσης ο ίδιος έπαιρνε χυμό από τη ρίζα του μανδραγόρα και έφτιαχνε ένα αραιωμένο μείγμα ελεγχόμενης δοσολογίας, καθώς μεγάλες δόσεις μπορούσαν να είναι επικίνδυνες. Γνώριζε τόσο τη θεραπευτική αξία και τη χρησιμότητά του φυτού αυτού, για την προνάρκωση και τη νάρκωση, όσο και τις παρενέργειες που μπορεί να προκαλέσει. Το υπερικό του Διοσκουρίδη, σήμερα γνωστό ως βάλασμο, χρησιμοποιείτο κυρίως για τη θεραπεία των πληγών. Είχε περιγράψει ακόμη τις τοξικές ιδιότητες της άτροπου (*Atropa belladonna*) ως εξής:

στο βάρος μιας αρχαίας δραχμής μπορούσε να προκαλέσει φαντασιώσεις, σε διπλή δόση οι φαντασιώσεις κρατούσαν τέσσερις ημέρες, και σε τετραπλή δόση προξενούσε τον θάνατο. Δέκα ή δώδεκα καρποί είναι θανατηφόροι. Είχε, ακόμη, παρατηρήσει και περιγράψει το φαινόμενο της αλλεργικής καταπληξίας από τη λήψη φαρμακευτικών ουσιών^{24 25 26}.

Αντίγραφο του πολύτομου έργου του, *Περί Ιατρικής Ύλης*, μεταφρασμένα σε ευρωπαϊκές και ανατολικές γλώσσες, βρίσκονταν σε διαρκή κυκλοφορία, από τον 5^ο αιώνα κιάλας, και χρησιμοποιούνταν στην πράξη από την περίοδο της ακμής της ρωμαϊκής αυτοκρατορίας. Το έργο ήταν ήδη πολύ γνωστό στην εποχή του Γαληνού ενώ μεταφράστηκε στα συριακά, τα λατινικά και τα αραβικά. Το παλαιότερο αντίγραφο που διασώθηκε είναι του 512 μ. Χ. και απεικονίζει 391 φυτά. Το πρωτότυπο του Διοσκουρίδη φαίνεται ότι περιείχε 435 φυτά, 400 από τα οποία αναφέρει και ο Ορειβάσιος (343-403) στο βιβλίο του *Ιατρικαί συναγωγαί*. Η πρώτη πλήρης λατινική μετάφραση του έργου εντοπίζεται στην Ιταλία του έκτου αιώνα ενώ η πρώτη λατινική έκδοσή του χρονολογείται το 1478, λίγες δεκαετίες μετά την ανακάλυψη της τυπογραφίας. Οι Άραβες απεκάλεσαν τον Διοσκουρίδη «Απεσταλμένο του Θεού της Βοτανικής». Ο ισλαμικός κόσμος τον αναγόρευσε σε σημαντικότερο φαρμακογνώστη όλων των εποχών, θεμέλιο και σημείο αναφοράς της ιαματικής τέχνης. Η προκαταρκτική συριακή μετάφραση του Χουνάιν μπεν Ισαάκ ανάγεται στις αρχές του 9^{ου} αιώνα και χρησιμεύει ως βάση για την πρώτη αραβική απόδοση, προϊόν συνεργασίας του σοφού ραββίνου με τον χριστιανό μαθητή του Στέφανο. Ο Άλδος Μανούτιος, το 1499, τύπωσε την πρώτη ελληνική έκδοση του πεντάτομου *Περί Ιατρικής Ύλης*, αμέσως μετά την Αγία Γραφή, γεγονός που αποδεικνύει τη σημασία του έργου. Τα χειρόγραφα με την πραγματεία του Διοσκουρίδη, ιδιαίτερα τα παλαιότερα, όπως ο κώδικας της Μονής Μεγίστης Λαύρας (έργο 10^{ου} αιώνα) και της Μονής Ιβήρων (έργο του 15^{ου} αιώνα) του Αγίου Όρους, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Το πιο γνωστό και πολύτιμο αντίγραφο είναι αυτό που φυλάσσεται από το 1592 έως σήμερα στην Αυτοκρατορική Βιβλιοθήκη της Βιέννης (Cod. med. gr. 1, Κωνσταντινουπολιτικός κώδικας). Αντιγράφηκε κατ' εντολήν των κατοίκων και των συντεχνιών του Πέρα το 512 μ.Χ. και δωρήθηκε στην Julia Anicia (Ιουλιανή εξ Αμικίων). Άλλα πολύτιμα αντίγραφα είναι ο Νεαπολιτικός Κώδικας (τέλη 6^{ου}-αρχές 7^{ου} αιώνα μ.Χ.) ο οποίος από το 1923 βρίσκεται στην Εθνική Βιβλιοθήκη της Νάπολης, πανομοιότυπο έργο που εκδόθηκε το 1988 (Εκδ. Μίλητος) διάφοροι αραβικοί κώδικες, και οι περίφημοι τουρκικοί κώδικες στο Τοπ Καπί της Κωνσταντινούπολης. Στα σωζόμενα παλαιά χειρόγραφα του έργου του υπάρχουν μεν απεικονίσεις των περιγραφόμενων φυτών, πολλές φορές όμως αυτές δεν ανταποκρίνονται στην πραγματική μορφή του φυτού^{24 25 26}.



Εικόνα 17. Αναπαράσταση του φυτού μανδραγόρας σε κώδικα του Περί Ιατρικής Ύλης και φύλλον 3 του Κωνσταντινουπολιτικού κώδικα-6^{ος} αιώνας μ.Χ.

Ένα δεύτερο έργο (2 βιβλία) με τίτλο *Περί ευπορίστων απλών τε και συνθέτων φαρμάκων*, που παλαιότερα θεωρείτο ψευδεπώνυμο, αποδίδεται πλέον από τους περισσότερους ερευνητές στον Διοσκουρίδη, όπως επίσης το *Περί παιωνίας και όσα ποιείν δύναται*, αλλά και η δεκατετράτομη ιατρική βίβλος κατά παραγγελία της Κλεοπάτρας. Άλλα, επίσης φαρμακολογικά βιβλία είναι αμφισβητούμενα καθώς ενώ φαίνεται να μιμούνται το ύφος του μεγάλου φαρμακολόγου, θεωρούνται νεότερα. Αυτά είναι τα έργα: *Περί δηλητηρίων φαρμάκων και της αυτών προφυλακής και θεραπείας*, *Περί ιοβόλων εν ώ και περί λυσσώντος κυνός* και *Περί λίθω*. Αν και ο Διοσκουρίδης είχε στόχο να μείνει στο επίπεδο της φυσιοκρατίας, δεν απέφυγε στο έργο του την αναφορά μερικών "μαγικών" ουσιών, οι οποίες φαίνεται ότι ήταν διαδεδομένες εκείνη την εποχή. Το *Περί Ιατρικής Ύλης* του Διοσκουρίδη, που μπορεί να θεωρηθεί ως το πρώτο (διασωζόμενο) σύγγραμμα φαρμακολογίας, επηρέασε σημαντικά τους επομένους συγγραφείς, ανάμεσα στους οποίους και το Γαληνό. Η επίδραση του έργου του εκτείνεται χρονικά τουλάχιστον μέχρι την περίοδο της Αναγέννησης και εν γένει εκτιμάται πως οι μέθοδοι παρατήρησης του Διοσκουρίδη πρόσφεραν ισχυρές βάσεις για την εξέλιξη της φαρμακολογικής επιστήμης. Το έργο του μελετάται μέχρι και σήμερα, διότι παρουσιάζει τεράστιο ενδιαφέρον για πολλούς τομείς. Πέρα από την αξία του ως ιατρικό εγχειρίδιο, μεγάλης αξίας θεωρείται ο πλούτος των πληροφοριών που δίνει για τα φυτά και βότανα της Νοτιοανατολικής Ευρώπης. Με την ανάδειξη της οργανικής χημείας από το 19^ο αιώνα, υποχώρησαν οι συνταγές του Διοσκουρίδη με βοτανολογικά στοιχεία, οι οποίες όμως συνέχισαν να χρησιμοποιούνται παραλλαγμένες στη λαϊκή θεραπευτική^{24 25 26}.

2.4 Νικόλαος Ιερόπαις

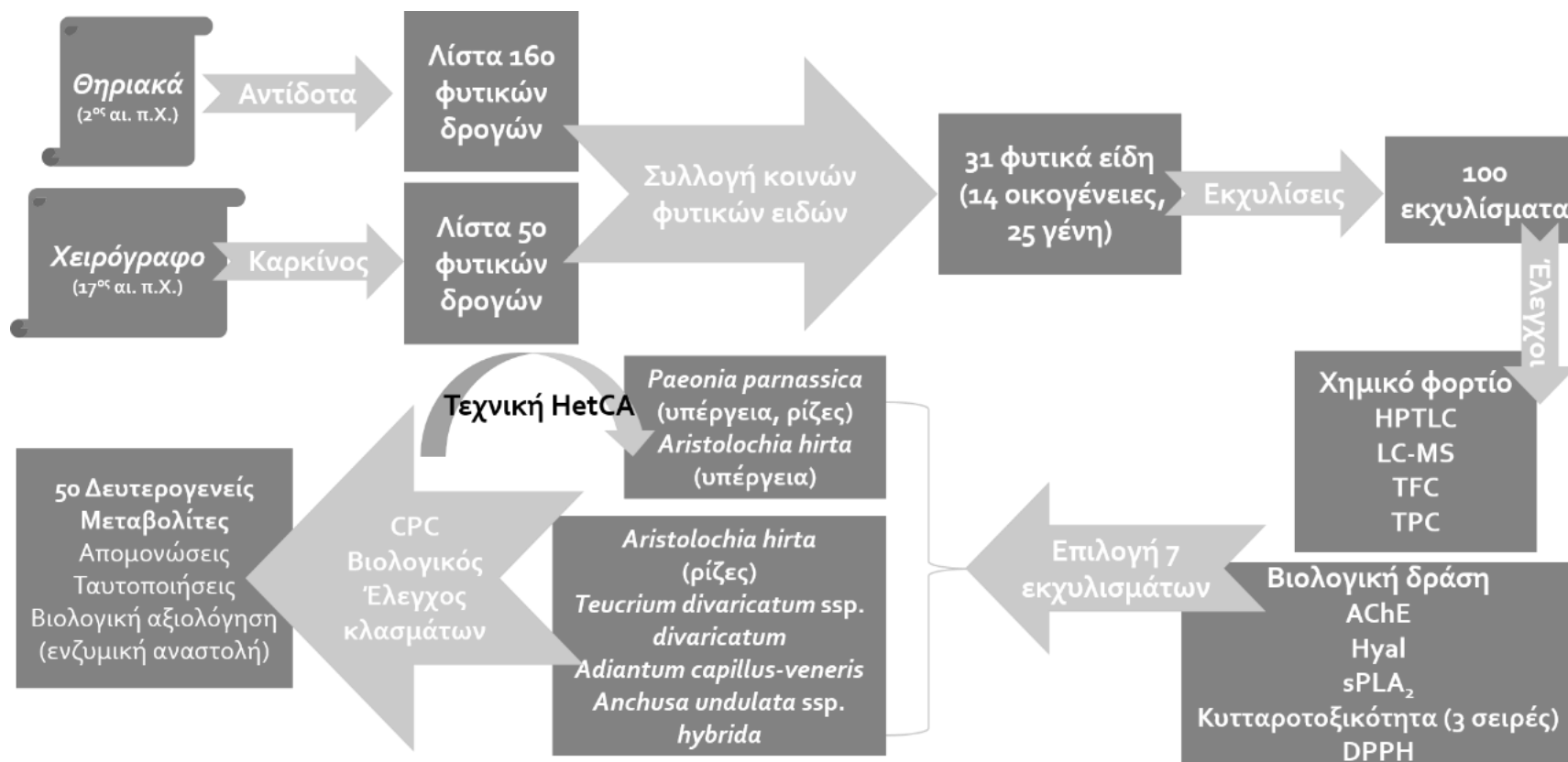


Εικόνα 18. Χειρόγραφο

Κατά τον 17^ο αιώνα μ.Χ. σημαντική φυσιογνωμία για τον ιατρικό κλάδο αποτέλεσε ο Νικόλαος Ιερόπαις (περίπου β' τέταρτο 16^{ου} αιώνα, (ίσως) 1630 μ.Χ.-1703 μ.Χ.). Λίγα είναι τα δεδομένα που υπάρχουν σχετικά με τη ζωή και τη δράση του συγκεκριμένου ιατρού και λόγιου. Το επώνυμο Ιερόπαις οφείλεται στον πατέρα του ο οποίος ήταν ιερέας. Καταγόταν από το χωριό Βελκοδίνο ή Βελισδόνη (νυν Τρίδενδρο) των Αγράφων (Ευρυτανία). Αναφέρεται επίσης και ως Νικόλαος Παπαδόπουλος, Νικόλαος Αγραφιώτης, Νικόλαος Βελισδονίτης, Νικόλαος Ιατρός. Μαθήτευσε δίπλα στο μεγάλο ιερομόναχο και δάσκαλο του Γένους, Ευγένιο Γιαννούλη (περ. 1597-1682), ο οποίος δίδασκε στη Σχολή Καρπενησίου την οποία είχε ιδρύσει το 1645. Δίπλα σε αυτόν έμαθε Γραμματική και εν μέρει την ποιητική τέχνη, καθώς μετέπειτα διέρρηξε τις σχέσεις του μαζί του και ολοκλήρωσε την εγκύκλιο παιδεία του σε σχολή στο Καρπενήσι που είχε ιδρύσει παλαιότερος μαθητής του, ο Αναστάσιος Παντοδύναμος. Σύμφωνα με τον βιογράφο και μαθητή του Γιαννούλη, ιερομόναχο Αναστάσιο Γόρδιο (περ. 1654-7 Ιουνίου 1729), από τον οποίο αντλούνται οι πειρσσότερες πληροφορίες για τον Ιερόπαιδα, σύντομα διακρίθηκε για την ευστροφία του και ξεκίνησε την ενασχόλησή του με την Ιατρική. Κατά την μετάβασή του στην Αθήνα, ήρθε κοντά με τον Ιεζεκιήλ Στεφάκη, ηγούμενο κάποιας μονής. Θέλησε να διδαχθεί τη Λογική, την αραβική γλώσσα και την Ιατρική. Μετά τη σύντομη παραμονή του, επισκέφθηκε τη Λάρισα όπου καταπιάστηκε με τη μελέτη αραβικών κειμένων και συγγραμμάτων ιατρικής. Επόμενος σταθμός ήταν η Κωνσταντινούπολη όπου αποκατέστησε τις σχέσεις του με τον Ευγένιο Γιαννούλη ενώ απευθύνθηκε στο Πατριαρχείο από το οποίο έγινε δεκτός λόγω της οξύνοιας και της ευγλωττίας του ενώ καθιερώθηκε ως σεβαστό πρόσωπο στην Κωνσταντινούπολη χάρη στην άρτια ιατρική του κατάρτιση και στην καλή επαγγελματική του φήμη. Επίσης διετέλεσε

αρχίατρος του Σουλτάνου. Δίδαξε στις ιατρικές σχολές του Τυρνάβου και του Αιτωλικού. Πιστεύεται ότι κατά τη διάρκεια που έζησε ο Ιερόπαις υπήρξε έντονη ιατρική εκπαιδευτική δραστηριότητα σε πολλά σημεία της Ελλάδας. Αποτελεί τον συγγραφέα 8 πολύ σημαντικών έργων με ιατρικό περιεχόμενο στα οποία αναφέρονται οι αντιλήψεις του και οι διάφορες μέθοδοι ίασης των ασθενειών. Ανάμεσα σε αυτά είναι η *Πραγματεία περί Φυσιολογίας και Παθολογίας* στην οποία διακρίνεται η έντονη ιπποκρατική αντίληψη ακόμη και 22 αιώνες μετά το θάνατο του μεγάλου θεραπευτή. Το έργο πιστεύεται ότι απευθύνεται στους μαθητές - ιατρούς του Ιερόπαιδα. Όπως αναφέρει ο Σπ. Λάμπρος στον "*Ελληνομνήμονα*" (τόμος 3, σελίδα 473) ο Νικόλαος Ιερόπαις έγραψε τα *Βιβλίον Φαρμακοποιίας καλούμενον Αυγή των Ιατρών ερανισμένον έτι πολλών παλαιών τε και νέων* το οποίο σώζεται σε χειρόγραφο κώδικα της Βιβλιοθήκης της Βουλής, *Αντιδοτάριον εξηγημένον από την Ιταλικήν γλώσσαν..., Εκδόσεις μερικαί εις αρχάριον ιατρόν, Βιβλίον καλούμενον Εκλογή, φάρμακα περιέχον... , Βίβλος Ιατρική..., Θεραπευτική μέθοδος εν συντομία...* Άλλο έργο του είναι το *Λεξικόν τινών βοτάνων συναχθέν παρά του εν ιατροίς λογιωτάτου Ιερόπαιδος του Αγραφιώτου κατά διαλέκτους τέσσαρας, ελληνικήν, ιταλικήν, αραβικήν και κοινήν*. Κατά μια προσέγγιση τα έργα του θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως έργα αλχημείας, καθώς μέσα από αυτά αποκάλυψε έναν αριθμό συνταγών ιατρικής, οι οποίες αφορούν νόσους κεφαλής, λαιμού, θώρακος, κοιλίας και άκρων και ιδιαίτερα των γυναικών και των παιδιών. Ασχολήθηκε με την παρασκευή βασικών φαρμάκων για διάφορες παθήσεις και ιδιαίτερα εναντίον της σύφιλης. Στο έργο *Εκδόσεις μερικαί εις αρχάριον ιατρόν* μπορούμε να βρούμε πολλές συνταγές με κύρια συστατικά τους τα φυσικά υλικά, αλλά και κάποιες με μέταλλα των αλχημιστών όπως τους ονομάζει. Ο ίδιος δεν κατατάσσει τον εαυτό του ανάμεσα τους, παρότι μεγάλο μέρος των συνταγών του απαιτούσε γνώσεις αλχημείας. Εφάρμοζε πρακτικές προερχόμενες από την αρχαία ελληνική και βυζαντινή παράδοση καθώς και από την ιατρική παράδοση της Ανατολής όπως βελονισμό, βεντούζες, σταχτοφούσκια, θεραπεία πνευμόνων με ζεστά κρεμμύδια κ.ά. Μετά τον Ιερόπαιδα οι θεωρίες του Ιπποκράτη αρχίζουν να εξασθενούν μιας και η χώρα αγωνίζεται να αποτινάξει τον Οθωμανικό ζυγό^{27 28}.

3 Σχεδιασμός πειραματικής πορείας



Εικόνα 19. Διαγραμματική απεικόνιση πειραματικής πορείας

4 Οι φυτικές δρόγες των Θηριακών

Πίνακας 1. Οι φυτικές δρόγες των Θηριακών

	Αναφορά Θηριακών	Λατινική ονομασία	Οικογένεια
1	Άβρότονον	<i>Artemisia abrotanum</i> L. ^{DD,DS,GD,DL} <i>Artemisia campestris</i> L. (άρρεν) ^{DD}	Compositae
2	άγλιθες	<i>Allium sativum</i> L. ^{GD,K,DS,CD}	Amaryllidaceae
3	ἄγνου σπέρμα λύγος	<i>Vitex agnus-castus</i> L. ^{GD,K,DS,LS}	Lamiaceae
4	ἀγχούσης χαίτη - ἄγχουσα	<i>Alkanna tinctoria</i> (L.) Tausch. ^{K,LS} <i>Echium diffusum</i> Sm. ^{DL,SD,GD} <i>Lithospermum fruticosum</i> L. ^{DL,SD,GD}	Boraginaceae
5	ἀδιάντον	<i>Adiantum capillus-veneris</i> L. ^{L,JH,GD,K,KR}	Pteridaceae
6	αιγίλοπος πέτηλα	<i>Aegilops ovata</i> L. ^{GD,K,DL} <i>Aegilops macrochaeta</i> Shuttlew. & A. Huet ex Duval ^{DS,LH} <i>Aegilops geniculata</i> Roth ^{DC}	Poaceae
7	ἄκανθα λευκή, ἄκανθος	<i>Cnicus ferox</i> L. ἤ <i>Cnicus acarna</i> (L.) L. ^{DL,GD} <i>Acanthus mollis</i> L. ^H <i>Acanthus spinosus</i> L. ^{DS}	Compositae Acanthaceae
8	ἀκτέα, ἀκτῆ	<i>Sambucus nigra</i> L. ^{DL,DS,GD,K,DD}	Adoxaceae
9	ἀμάρακος, σάμψυχον	<i>Origanum majorana</i> L. ^{GD,DS,DD,K,KA}	Lamiaceae
10	ἄνησσον	<i>Pimpinella anisum</i> L. ^{SD,CD,DS,KR}	Apiaceae
11	ἀπαρίνης χυλόν	<i>Galium aparine</i> L. ^{GD,DS}	Rubiaceae
12	ἀριστολόχεια	<i>Aristolochia rotunda</i> L. ^{DC,GD,K,DL} <i>Aristolochia longa</i> L., <i>Aristolochia clematidis</i> L. ^{DC,GD,K,DL}	Aristolochiaceae

	Αναφορά Θηριακών	Λατινική ονομασία	Οικογένεια
13	άρκευθίς ^{LS,DD,H} (ο καρπός της άρκεύθου, κεδρόμηλο) άρκευθίς μεγάλη, άρκευθίς μικρά κέδρος	<i>Juniperus communis</i> L. ^{DL,DS,GD,K,PL} <i>Juniperus phoenicea</i> L. <i>Juniperus oxycedrus</i> L. <i>Juniperus excelsa</i> M.Bieb. ^{B,DL,DS,GD,DD,LS}	Cupressaceae
14	άρκτιον ^{DD}	<i>Inula candida</i> (L.) Cass. ^{DS,GD,DD,DL} <i>Celsia orientalis</i> L.	Compositae Scrophulariaceae
15	άσφοδέλου νέον μόσχον – ρίζαν	<i>Asphodelus</i> sp. ^{DL,GD,K} <i>Asphodelus ramosus</i> L. ^{DD}	Xanthorrhoeaceae
16	βάλσαμον	<i>Commiphora gileadensis</i> (L.) C.Chr. ^{CD} <i>Commiphora opobalsamum</i> (L.) Engl. ^{DL,GD,K} <i>Commiphora mukul</i> (Hook. ex Stocks) Engl. ^{KR}	Burseraceae
17	βάτος	<i>Rubus fruticosus</i> L. ^{GD,K} <i>Rubus idaeus</i> L. ^{DS} <i>Rubus ulmifolius</i> Schott ^{B,DL,DS} <i>Rubus vulgaris</i> Weihe and Nees ^{GH,DS,DC}	Rosaceae
18	βλήτρου χαίτην	<i>Blechnum spicant</i> (L.) Sm. ^{DD,GD,AC,AM}	Blechnaceae
19	βλήχων (γλήχων)	<i>Mentha pulegium</i> L. ^{DL,GD,B,H}	Lamiaceae
20	βουπλεύρου σπέρματα, βούπλευρον	<i>Brassica napus</i> L. ^{DL,GD,K} <i>Ammi majus</i> L. ^{DD} <i>Bupleurum fruticosum</i> L. ^{GN}	Cruciferae Apiaceae
21	βρυωνίδος ρίζα - βρυώνη, βρυωνίς ψίλωθρον	<i>Bryonia cretica</i> subsp. <i>dioica</i> (Jacq.) Tutin ^{DL,B,GD,K,LS,GD} <i>Tamus communis</i> L. ^{DL,DS,GD}	Cucurbitaceae Dioscoreaceae
22	γλυκουσίδης ρίζα	<i>Paeonia</i> sp. ^{B,KA,DL,SU} <i>Paeonia officinalis</i> L. ^{LS,DS,GD} <i>Paeonia mascula</i> (L.) Mill. ^{B,K,GD}	Paeoniaceae
23	Δαύκειον	<i>Athamanta cretensis</i> L. ^{DS,GD,K}	Apiaceae
24	δάφνης καρπός δάφνης σπερμεΐα	<i>Laurus nobilis</i> L. ^{B,DL,DS,GD,DD,LS} <i>Laurus angustifolia</i> Willd. ex Nees ^{GD,K}	Lauraceae

	Αναφορά Θηριακών	Λατινική ονομασία	Οικογένεια
25	Δράκων (καυλείον δράκοντος)	<i>Dracunculus vulgaris</i> Schott ^{B,DS,GD,DD,LS} <i>Arum maculatum</i> L. ^{GD,K}	Araceae
26	ειρύσιμον (έρύσιμον)	<i>Sisymbrium officinale</i> (L.) Scop. ^{DL,DS} <i>Sisymbrium irio</i> L. ^{DL,DS} <i>Sisymbrium polyceratium</i> L. ^{L,GD,K,DL,DS} (syn. <i>Erysimum polyceratium</i> (L.) Link) <i>Erysimum graecum</i> Boiss. & Heldr.	Brassicaceae
27	έλελίσφακον	<i>Salvia</i> sp. ^{DL,GD,DS,B} <i>Salvia officinalis</i> L. ^{GD} <i>Salvia pomifera</i> L. ^{GD,K}	Lamiaceae
28	έλίχρυσος	<i>Helichrysum</i> sp. ^{DS,K} <i>Helichrysum orientale</i> L. ^{DL,K} <i>Helichrysum siculum</i> Jord. & Fourr. ^{DD} <i>Helichrysum italicum</i> (Roth) G. Don (syn. <i>Helichrysum italicum</i> subsp. <i>italicum</i>) <i>Helichrysum italicum</i> subsp. <i>microphyllum</i> (Willd.) Nyman	Asteraceae
29	έλλεβόρου μελανόχροος κάρφρα	<i>Helleborus niger</i> L. ^{DD,DS,TH,GD} <i>Helleborus cyclophyllus</i> Boiss. ^{AB,B,GD,DL,K}	Ranunculaceae
30	έλξινη κολλυβάτεια (κλύβατις κολυμβατία)	<i>Parietaria officinalis</i> L. ^{B,DL,DS,GD,K} (syn. <i>Helxine dioscoridis</i> Bubani) <i>Parietaria judaica</i> L. ^{GD,H,K}	Urticaceae
31	έρεβίνθου άγροτέρου σπερμεΐα ^{DD}	<i>Cicer reticulatum</i> Ladiz. ^{1,GD,K}	Fabaceae
32	έρείκη	<i>Erica arborea</i> L. ^{DD,K,DL,DS,GD} <i>Erica verticillata</i> P.J.Bergius <i>Erica carnea</i> L. ^{CP}	Ericaceae
33	έρινάδος κόκκυγας έρινεός κράδη	<i>Ficus carica</i> L. ^{DL,DS,DD,K} (syn. <i>Ficus caprificus</i> Risso) <i>Ficus sycomorus</i> L. ^B	Moraceae
34	έρπυλλος νομαίος	<i>Thymus serpyllum</i> L. ^{DD,K,GD} <i>Thymus sibthorpii</i> Benth. ^{DL,B}	Lamiaceae
35	έρυθρόδανον το βαφικόν	<i>Rubia tinctorum</i> L. ^{DD,DL,DS,K,GD} <i>Rubia peregrina</i> L. ^{DL,DS,GD}	Rubiaceae

	Αναφορά Θηριακών	Λατινική ονομασία	Οικογένεια
36	ἔχιος Ἀλκιβίου ρίζα ἐχίειον, ἔχιον	<i>Echium rubrum</i> Forssk. ^{DL,DS,DD,GD,K} <i>Echium plantagineum</i> L. ^{DL,B} <i>Echium vulgare</i> L. ^{DS,H}	Boraginaceae
37	ἡλιοτρόπιον (ἡελίοιο τροπαῖς ἰσώνυμον ἔρνος) = ἡλιοτρόπιον το μέγα	<i>Heliotropium europaeum</i> L. ^{DD,DL,DS,GD,K} <i>Heliotropium supinum</i> L.	Boraginaceae
38	ἡρύγγου ρίζα (ἥρυγγος)	<i>Eryngium campestre</i> L. ^{B,DL,DD,K} <i>Eryngium creticum</i> Lam. ^{DS,GD}	Apiaceae
39	θάψου Θρινακίην ρίζαν θάψος – θαψία	<i>Thapsia garganica</i> L. ^{KA,DL,DS,K,DD}	Apiaceae
40	Θρυαλλίς	<i>Phlomis lychnitis</i> L. ^{DL,DS,GD,K}	Lamiaceae
41	θύμβρης βλαστόν	<i>Satureja thymbra</i> L. ^{DL,DS,DD,K}	Lamiaceae
42	ἴον	<i>Viola odorata</i> L. ^{DD,DL,DS,K}	Violaceae
43	ἰππείου σελίνου σπερμεῖα	<i>Smyrniolum olusatrum</i> L. ^{DD,LS,DS} <i>Smyrniolum perfoliatum</i> L. ^{GD,K} <i>Apium graveolens</i> L. ^{DD,DL,DS,K,B}	Apiaceae
44	ἰππείου μαράθου ρίζα (ἰππομάραθρον, ἰππομάραθρον)	<i>Prangos ferulacea</i> Lindl. ^{B,DL,DS} <i>Hippomarathrum cristatum</i> Boiss. ^{GD,K} <i>Foeniculum vulgare</i> Mill. (syn. <i>Foeniculum capillaceum</i> Gilib.)	Apiaceae
45	ἴρις	<i>Iris x germanica</i> L. ^{E,GD,K,DD,DL,DS} (syn. <i>Iris x florentina</i> L. (Radix Iridae Florentianae) ^{GD}) <i>Iris attica</i> Boiss. & Heldr. ^H <i>Iris unguicularis</i> var. <i>angustifolia</i> (Boiss. & Heldr.) A.P. Davis & Jury ^H	Iridaceae
46	Καλάμινθος	<i>Calamintha</i> sp. ^{B,DL,DS} <i>Calamintha officinalis</i> Moench. ^{DS} <i>Acinos alpinus</i> Moench. ^{GD} <i>Clinopodium nepeta</i> (L.) Kuntze ^{DS,GD} <i>Mentha pulegium</i> L. ^{H,GD} <i>Mentha arvensis</i> L. ^H	Lamiaceae
47	κάρδαμον ἀπὸ Μήδων	<i>Elettaria cardamomum</i> (L.) Maton ^{DL,DS,B,GD,K} (syn. <i>Amomum cardamomum</i> L.)	Zingiberaceae

	Αναφορά Θηριακών	Λατινική ονομασία	Οικογένεια
48	Κάρδαμον	<i>Lepidium sativum</i> L. ^{B,GD,DL,DS,K,KA}	Brassicaceae
49	Καυκαλίσ	<i>Caucalis grandiflora</i> L. ^{DL,DS,B} <i>Caucalis daucoides</i> L. ^{GD,K,H} <i>Tordylium anthriscus</i> L. ^{GD} <i>Pimpinella saxifraga</i> L. ^{DS}	Apiaceae
50	κάχρυς, κάχριον λιβανωτίς	<i>Cachrys libanotis</i> L. ^{GD,DD,K,LS} <i>Rosmarinus</i> sp. ^{B,DL,DS,GD,K}	Apiaceae Lamiaceae
51	Κίκαμα	<i>Tordylium apulum</i> L. ^{HA,PN}	Apiaceae
52	κίκι κρότων	<i>Ricinus communis</i> L. ^{B,DL,DS,GD,K}	Euphorbiaceae
53	κίναμον (κιννάμωμον)	<i>Cinnamomum verum</i> J. Presl. ^{DS,GD} (syn. <i>Laurus cinnamomum</i> L. ^{E,DL,DS} , ίσως syn. <i>Persea cinnamomum</i> Spreng. ^{E,DL,DS}) <i>Cinnamomum tamala</i> (Buch.-Ham.) T. Nees and Eberm. ^{DS,GD} <i>Cinnamomum</i> spp. <i>Cinnamomum iners</i> Reinw. ex Blume ^{E,DL,DS} <i>Cinnamomum cassia</i> (L.) J. Presl ^{E,DL,DS} <i>Canella alba</i> Murray ^{E,DL,DS}	Lauraceae
54	κλήμα νέον έν βότρυσι οϊνάνθη	<i>Vitis vinifera</i> L. ^{E,DS,K,GD} <i>Vitis sylvestris</i> C. C. Gmel.(syn. <i>Vitis vinifera</i> L.) ^{DL, DS, K, GD, DD}	Vitaceae
55	κνίδης σπέρμα (άκνηστis)	<i>Urtica</i> sp. ^{DL,DS,GD,K} (Semina urticae romanae ^{GD}) <i>Urtica dioica</i> L. <i>Urtica urens</i> L. ^{DS,JF} <i>Urtica pilulifera</i> L. ^{CD,GD}	Urticaceae
56	κονίλη όρίγανον Ήράκλειον	<i>Origanum heracleoticum</i> L. ^{GD,K,DL,DS} <i>Origanum vulgare</i> L. ^{GD,DD,DL,DS,K}	Lamiaceae
57	κόνυζα χαμαϊζήλος κονύζης πολύχνοα φύλλα κονύζης βλαστόν	<i>Inula britannica</i> L. ^{DL,DS,GD,K,DD,LS} <i>Inula graveolens</i> (L.) Desf. ^{DL,E} (syn. <i>Dittrichia graveolens</i> (L.) Greuter ^{AA,RF}) <i>Inula viscosa</i> (L.) Aiton ^{GD,DL,E,DS} <i>Dittrichia viscosa</i> (L.) Greuter ^{AA,RF}	Asteraceae
58	κορίου ορειγενέος καρπός	<i>Coriandrum sativum</i> L. ^{DL,DS,GD,K,AD,H}	Apiaceae

	Αναφορά Θηριακών	Λατινική ονομασία	Οικογένεια
59	Κόρκορος	<i>Anagallis arvensis</i> L. ^{DL,GD} <i>Anagallis caerulea</i> L. ^{DL,E,GD,K}	Primulaceae
60	κοτυληδόνας ρίζα	(μάλλον η ετέρα κοτυλυδών του Διοσκουρίδη) <i>Saxifraga</i> sp. ^{DL,DS,GD,K}	Saxifragaceae
61	κρήθμον	<i>Crithmum maritimum</i> L. ^{DL,DS,GD,K,E}	Apiaceae
62	κρομμύου όπος	<i>Allium cepa</i> L. ^{GD,K,DS,CD,LS} <i>Allium ampeloprasum</i> L. ^{DL,DS,GD}	Amaryllidaceae
63	Κυκλάμιος	<i>Cyclamen graecum</i> Link ^{DL,DS,GD,K}	Primulaceae
64	κύμινον (καρπός ήμερου)	<i>Cuminum cyminum</i> L. ^{GD,K,DS,LS}	Apiaceae
65	κύμινον άγρότερον	<i>Lagoecia cuminoides</i> L. ^{DL,DS,K,GD} <i>Nigella arvensis</i> ^{DL,DS}	Apiaceae Ranunculaceae
66	κυπαρίσσου φόβη	<i>Cupressus sempervirens</i> L. ^{DS,GD,K,DD,LS}	Cupressaceae
67	Κύτισος	<i>Medicago arborea</i> L. ^{DL,DS,DD,LS,K,E}	Fabaceae
68	λευκάδος ρίζα (λευκάνθεμος λευκάς όρεινή)	<i>Lamium album</i> L. ^{TH,DL,DS,GD,K}	Asteraceae
69	λιβυκή ρίζα σίλφιον ^{DL,DS}	<i>Ferula tingitana</i> L. ^{E,DL,DS}	Apiaceae
70	λυκαψός, λύκοψις	<i>Echium italicum</i> L. ^{DL,DS,GD,K}	Boraginaceae
71	Λυχνίς	<i>Lychnis coronaria</i> Desr. ^{DL,DS,GD,KA} <i>Agrostemma githago</i> L. ^{DL,DS,GD,KA}	Caryophyllaceae
72	μελάνθειον, μελάνθιον	<i>Nigella sativa</i> L. ^{DL,DS,DD,LS}	Ranunculaceae
73	μελιλλώτου νέον στέφος	<i>Melilotus</i> sp. ^{E,DL,DS,GD} <i>Melilotus officinalis</i> (L.) Pall.	Leguminosae
74	μελισσοφύτου πέταλα	<i>Melissa officinalis</i> L. ^{DD,DL,DS,K}	Labiatae
75	μήκων έπιτηλίς	<i>Glaucium flavum</i> Crantz ^{DL,DS,DD,LS}	Papaveraceae
76	μήκων θυλακίς	<i>Papaver somniferum</i> L. ^{K,E,DL,DS,DD,LS}	Papaveraceae
77	μολόχη άγριάς	<i>Malva sylvestris</i> L. ^{LH,DC,DL,DS,K}	Malvaceae

	Αναφορά Θηριακών	Λατινική ονομασία	Οικογένεια
78	μυρικής νέος θάμνος πανάκαρπος	<i>Tamarix</i> sp. <i>Tamarix tetrandra</i> Pall. ex M. Bieb. ^B <i>Myrica cerifera</i> L. <i>Myrica gale</i> L.	Tamaricaceae Myricaceae
79	Μύρτα	<i>Myrtus communis</i> L. ^{DD,DL,DS,GS,LS}	Myrtaceae
80	νάρδος, νάρδου ρίζα	<i>Valeriana tuberosa</i> L., <i>Valeriana dioica</i> L., <i>Valeriana dioscoridis</i> Sm. ^{E,GD,DS} <i>Nardostachys jatamansi</i> (D.Don) DC ^{GD,K}	Caprifoliaceae
81	νάρθηκος χλοεροῦ ἥτρον – νάρθηξ ὄποϊο δάκρυα ὄπιου χυλόν (Ευτέκνιος) ὄπός Κυρηναϊκός ^{OS}	<i>Ferula communis</i> L. ^{E,DL,DS,DD,GD}	Apiaceae
82	νήρις - το νήριον	<i>Nerium oleander</i> L. ^{KA,K}	Apocynaceae
83	ὄνόγυρος	<i>Anagyris foetida</i> L. ^{CP,E,DL,DS,GD}	Fabaceae
84	ὄνου πετάλειον ὄνιτις	<i>Origanum onites</i> L. ^{DL,DS,GD,K}	Lamiaceae
85	ὄνωνις	<i>Ononis antiquorum</i> L., <i>Ononis spinosa</i> L., <i>Ononis repens</i> L., <i>Ononis arvensis</i> L. ^{DL,DS,GD,DD}	Fabaceae
86	ὄξαλις	<i>Oxalis corniculata</i> L. ^{GD,K,EB} <i>Rumex acetosa</i> L., <i>Rumex conglomeratus</i> Murray, <i>Rumex crispus</i> L. ^{DL,DS}	Oxalidaceae Polygonaceae
87	ὄρειον-πολύγονον θήλυ ^{LS}	<i>Hippuris vulgaris</i> L. ^{DL,DS,LS,DD,K}	Plantaginaceae
88	ὄριγανόεσσα χαιίτη, φύλλα ὄριγάνου, ὄριγανον	<i>Origanum vulgare</i> L. ^{GD,DD,DL,DS,K}	Lamiaceae
89	ὄρμινον	<i>Salvia horminum</i> L. ^{DL,DS} (syn. <i>Salvia viridis</i> L. ^{K,GD,DD})	Lamiaceae
90	παλίουρου καρπός και χαιίτη	<i>Paliurus spina-christi</i> Mill. ^{GD,K} (syn. <i>Paliurus australis</i> Gaertn. ^{DL,DS})	Rhamnaceae
91	πάνακες Φλεγυήιον	<i>Ferula nodosa</i> (L.) Benth. & Hook. f. ^{DD,DL,DS,K} <i>Echinophora tenuifolia</i> L. ^{DS,B,DL} <i>Hypericum olympicum</i> L.	Apiaceae Hypericaceae

	Αναφορά Θηριακών	Λατινική ονομασία	Οικογένεια
92	πάνακες Χειρώνιον	<i>Inula helenium</i> L. ^{B,DS} <i>Helianthemum ovatum</i> Dun. ^{B,DL,DS,GD,K} <i>Hypericum olympicum</i> L. ^{DL,DS}	Asteraceae Cistaceae Hypericaceae
93	Παρθένιον	<i>Chrysanthemum parthenium</i> (L.) Bernh. ^{DL,DS} (syn. <i>Tanacetum parthenium</i> (L.) Sch. Bip., <i>Pyrethrum parthenium</i> (L.) Sm. ^K) <i>Parietaria judaica</i> L. ^{GD}	Asteraceae Urticaceae
94	πενταπέτηλον	<i>Potentilla reptans</i> L. ^{DL,DS,GD,K}	Rosaceae
95	Πέπερις	<i>Piper nigrum</i> L. ^{DL,DS,DD,GD,K}	Piperaceae
96	περιστερέονος πέτηλα	<i>Lycopus europaeus</i> L. ^{DL,DS,GD,K} <i>Verbena officinalis</i> L. ^{DD,LS}	Labiatae Verbenaceae
97	πεταλίτις σκολοπένδρ(ε)ιον	<i>Scolopendrium officinale</i> DC. ^{DL,DS,DC,KA,K}	Aspleniaceae
98	πευκέδανον	<i>Peucedanum officinale</i> L. ^{DD,DL,DS,GD,K}	Apiaceae
99	πεύκης αγροτέρας σπόρια	<i>Pinus</i> sp. <i>Pinus pinea</i> L., <i>Pinus sylvestris</i> L. ^{DD,DL,DS,K}	Pinaceae
100	πηγάνιον πήγανον άγριον ρύτη	<i>Ruta graveolens</i> L. ^{DL,DS,K,GD} <i>Ruta chalepensis</i> L. ^{LS,DS} <i>Peganum harmala</i> L. ^{DD,CD}	Rutaceae Nitrariaceae
101	πίσσα εύωδεα (ξυλόπισσα)	<i>Betula</i> sp. (πιθανόν) (ελαιώδες αρωματικό υλικό (έκκριμα) που παράγεται από δέντρο του γένους <i>Betula</i> ή πεύκο)	Betulaceae
102	πιστάκιον, καρπός πιστακίας	<i>Pistacia vera</i> L. ^{DD,DL,DS,K}	Anacardiaceae
103	πλατάνου σφαίραι (πλάτανος)	<i>Platanus orientalis</i> L. ^{DL,DS,GD,K}	Platanaceae
104	πολίον, πόλιον	<i>Teucrium polium</i> L. ^{DD,K,GD,DL,DS}	Lamiaceae
105	πολύκνημον	<i>Ziziphora capitata</i> L. ^{DL,DS,GD,K} <i>Prunella vulgaris</i> L. ^{GD,DS}	Lamiaceae
106	πουλύγονον πολύγονον άρρεν	<i>Polygonum aviculare</i> L. ^{DD,DL,DS}	Polygonaceae

	Αναφορά Θηριακών	Λατινική ονομασία	Οικογένεια
107	πράσιον (μελίφυλλον, μελίκταινα) (ο Νίκανδρος τα ταυτίζει)	<i>Marrubium vulgare</i> L. ^{DL,DS,GD,K} <i>Marrubium creticum</i> Mill.	Lamiaceae
108	πράσον χλοερόν	<i>Allium ampeloprasum</i> L. ^{GD,DS,DD,LS} (syn. <i>Allium porrum</i> L. ^{DL,DS,K,GD})	Amaryllidaceae
109	Πυράκανθα	<i>Cotoneaster pyracantha</i> E. Pritz. ^{DL,DS,GD,K} (syn. <i>Crataegus pyracantha</i> Brandis) <i>Crataegus oxyacantha</i> L.	Rosaceae
110	Πύρεθρον πυρϊτις	<i>Anacyclus pyrethrum</i> (L.) Lag. ^{DL,DS,DD,GD,K} <i>Pyrethrum parthenium</i> (L.) Sm. (syn. <i>Tanacetum parthenium</i> (L.) Sch. Bip.) ^{GD,K}	Asteraceae
111	ράμνος φιλεταιρίς	<i>Rhamnus cathartica</i> L. ^{DL,DS,CD,GD,K} <i>Rhamnus oleoides</i> L. ^{DL,DS,CD,GD,K} (<i>Rhamnus graeca</i> Boiss. & Reut. (syn. <i>Rhamnus lycioides</i> subsp. <i>graeca</i> (Boiss. & Reut.) Tutin) ^{KA,TH}	Rhamnaceae
112	ρόδον, ρόδεον ροδιή	<i>Rosa</i> sp. ^{DL,DS,DD,GD,K} <i>Rosa centifolia</i> L. ^{DD,LS,DS}	Rosaceae
113	σελίνου σπερμεία	<i>Apium graveolens</i> L. ^{DL,DS,DC,GD,K}	Apiaceae
114	σίδης νεαλεῖς ὀρόβακχοι	<i>Punica granatum</i> L. ^{DD,DL,DS,GD,K}	Lythraceae
115	σίδη, σίδα	<i>Nymphaea alba</i> L. ^{DS,TH,DL,DS,DD,LS}	Nymphaeaceae
116	σίκυος ρίζα	<i>Ecballium elaterium</i> (L.) A. Rich. ^{K,DL,DS,GS}	Cucurbitaceae
117	Σίνηπι	<i>Sinapis alba</i> L. ^{DC,DL,DS,GD,K} <i>Brassica nigra</i> (L.) Koch ^B	Brassicaceae
118	Σίσυμβρον	<i>Nasturtium officinale</i> R. Br. ^{DL,DS} <i>Cardamine raphanifolia</i> ssp. <i>acris</i> (Griseb) O.E. Schulz ^K <i>Mentha sylvestris</i> L. ^{DS}	Brassicaceae Lamiaceae
119	σκήλλης νιφόεν κάρη αὔά σπειρεα βολβῶν	<i>Urginea maritima</i> (L.) Baker ^{DL,DS,GD} (syn. <i>Drimia maritima</i> (L.) Stearn) <i>Scilla autumnalis</i> L. ^K	Asparagaceae
120	σκορπίον, σκορπιοειδές	<i>Coronilla scorpioides</i> (L.) Koch ^{DL,DS,DD,GD,K} <i>Scorpiurus muricatus</i> L. ^{B,LS}	Fabaceae
121	σκύρον (ἄσκυρον)	<i>Hypericum perforatum</i> L. ^{DL,DS,GD,K}	Hypericaceae
122	Σμύρνα	<i>Commiphora myrrha</i> (Nees) Engl. (syn. <i>Balsamea myrrha</i> Baill.) <i>Commiphora anglosomaliae</i> Chiov., <i>Commiphora abyssinica</i> (Engl.) Engl. ^{B,DL,DS,GD,D,K,LS}	Burseraceae

	Αναφορά Θηριακών	Λατινική ονομασία	Οικογένεια
123	σμουρνέϊον	<i>Smyrniium perfoliatum</i> L. ^{DL,DS,GD,K}	Apiaceae
124	σταφίς άγροτέρα	<i>Delphinium staphisagria</i> L. ^{DL,DS,DC}	Ranunculaceae
125	σταφυλίνας	<i>Daucus carota</i> L. ^{GD,K,DL,DS}	Apiaceae
126	Στρώχνος	<i>Solanum nigrum</i> L. ^{DL,DS,EB,PL}	Solanaceae
127	σφονδύλειον	<i>Heracleum sphondylium</i> L. ^{DL,DS,GD,K}	Apiaceae
128	Τηλέφιλον	<i>Andrachne telephioides</i> L. ^{DC,DL,DS,GD,K}	Phyllanthaceae
129	Τιθύμαλλος	<i>Euphorbia resinifera</i> O. Berg ^{DL,DS} <i>Euphorbia characias</i> L., <i>Euphorbia myrsinites</i> L., <i>Euphorbia paralias</i> L., <i>Euphorbia peplus</i> L. ^{B,LS,DD}	Euphorbiaceae
130	Τόρδειλον	<i>Tordylium officinale</i> L. ^{DC,DL,DS,GD,K}	Apiaceae
131	τρεμίθου σπέρματα	<i>Pistacia terebinthus</i> L. ^{DL,DS,GD,K}	Anacardiaceae
132	Τρίσφυλλον τριπέτηλον μινουανθές	<i>Psoralea bituminosa</i> L. ^{DL,DS,GD} <i>Menyanthes</i> sp. ^{GD}	Fabaceae Menyanthaceae
133	ύακίνθου καρπόν	<i>Chionodoxa nana</i> (Schult. & Schult.f.) Boiss. & Heldr. (syn. <i>Scilla nana</i> (Schult. & Schult.f.) Speta) ^{DL,DS} (syn. <i>Hyacinthus nanus</i> Schult. & Schult.f. ^{GD})	Asparagaceae
134	ΰσσωπος	<i>Micromeria graeca</i> (L.) Benth. ex Rchb. (syn. <i>Satureja graeca</i> L.) ^{DL,DS} <i>Hyssopus officinalis</i> L. ^{DD}	Lamiaceae
135	φηγού φλοιός	<i>Fagus sylvatica</i> L. TH <i>Quercus lanuginosa</i> Beck (syn. <i>Quercus robur</i> L.) ^{GD,K}	Fagaceae
136	Φλόμος	<i>Verbascum</i> sp. ^{DL,DS,B} <i>Verbascum orientale</i> (L.) All. ^{GD,K} <i>Phlomis lychnitis</i> L. ^{DS}	Scrophulariaceae Lamiaceae
137	φῦκος	<i>Cystoseira foeniculacea</i> (Beck)E, DL, DS	Sargassaceae
138	χαμαίλεων αιγλήεις χαμαίλεων όρφνός	<i>Atractylis gummifera</i> Salzm. ex L. ^{DL,DS,GD} (syn. <i>Carlina gummifera</i> (L.) Less. ^H) <i>Cardopatum corymbosum</i> (L.) Pers. ^K	Asteraceae
139	χαλβανίδες ρίζαι χαλβάνη	<i>Ferula galbaniflua</i> Boiss. & Buhse, <i>Ferulago galbaniflora</i> (Mill.) W.D.J. Koch ^{DL,DS,DD,K,LS} <i>Ferula rubricaulis</i> Boiss. ^{GD}	Apiaceae

	Αναφορά Θηριακών	Λατινική ονομασία	Οικογένεια
140	χαμαικυπάρισσος κυπάρισσος ποίη	<i>Santolina chamaecyparissus</i> L. ^{DD,K,GD}	Asteraceae
141	Χαμαίπιτυς πίτυς χαμηλή	<i>Ajuga</i> sp. ^{DL,DS,DC} <i>Ajuga chamaepitys</i> (L.) Schreb., <i>Ajuga iva</i> (L.) Schreb. ^{DC,GD,K}	Lamiaceae
142	Χείρωνος ρίζα	<i>Centaurea centaurium</i> L. ^{DL,DS,B} <i>Centaureum erythraea</i> Rafn ^{GD,K,DL,DS,B}	Asteraceae Gentianaceae
143	χελιδονίου πέτηλα	(μέγα) <i>Chelidonium majus</i> L. ^{DL,DS,DD,GD,K} (μικρόν) <i>Ficaria verna</i> Huds. ^{DL,DS,DD,GD,K}	Papaveraceae Ranunculaceae

Με τη σύντμηση *syn.* σημειώνονται τα συνώνυμα είδη.

AA: Aetius, 1534. Aetiou Amidēnou Bibliōn iatrikōn.

AD: Academic Dictionaries and Encyclopedias (ιστοσελίδα, <http://www.enacademic.com/>).

AM: George Ripley & Charles Anderson Dana, 1883. The American Cyclopaedia.

B: Berendes, 1902. Des Pedanios Dioskurides aus Anazarbos Arzneimittellehre. Stuttgart, Ferd. Enke.

CD: Juliana Anicia Codex, Codex Neapolitanus, and Morgan 652 (ιστοσελίδα, <http://tulip.hort.purdue.edu/herbalimages/search.html>).

CP: Χάρης Πάτσης, 1978. Νέα Ελληνική Εγκυκλοπαίδεια.

DD: Δημητράκος, Δ., 1966. Μέγα Λεξικόν της Ελληνικής Γλώσσης. Δομή, Αθήνα.

DL: Μαυρόπουλος, Θ., 2006. Διοσκουρίδης: Περί Ύλης Ιατρικής, Λόγοι Πέντε (Αποσπάσματα). Ζήτηρος, Θεσσαλονίκη.

DS: Universidad Salamanca, España, Dioscórides Manuscrito de Salamanca (ιστοσελίδα, <http://dioscorides.usal.es>).

EB: Encyclopædia Britannica (ηλεκτρονική εγκυκλοπαίδεια, <https://www.britannica.com>).

GD: Γεννάδιος, Π., 1914. Φυτολογικό Λεξικό. Εκδόσεις Γκιούρδας, Αθήνα.

HA: Ησύχιος ο Αλεξανδρεύς. Λεξικόν (5^{ου} αιώνα μ.Χ.).

JH: John G. Hatfield, 1886. The Botanic Pharmacopœia: Comprising the Materia Medica, Doses and Preparations of the Medicines Employed in the Botanic Practice).

JF: Hammerich, J.F., 1834. Dr. Joh. Christ. Mössler's Handbuch der gewächskunde, enthaltend eine flora von Deutschland mit hinzufügung der wichtigsten ausländischen cultur-pflanzen.

K: Καββαδάς, Δ., 1956. Εικονογραφημένον βοτανικόν, φυτολογικόν λεξικόν. Αθήνα.

KA: Κοραής, Αδαμάντιος, 1805. Άτακτα.

KR: Κριαράς, Ε., 2010 (διαδικτυακό λεξικό, http://www.greek-language.gr/greekLang/medieval_greek/kriaras).

LH: Linnaean Herbarium (ιστοσελίδα, The Linnean Society of London, http://linnaean-online.org/linnaean_herbarium.html).

LS: Liddell-Scott-Jones. Αγγλο-ελληνικό διαδικτυακό λεξικό (<http://www.tlg.uci.edu/ljsj>).

PL: The Plant List (βάση δεδομένων) (<http://www.theplantlist.org>).

RF: Ρήγας (Βελεστινλής), 2000. Φυσικής απάνθισμα δια τους αγχίνους και φιλομαθείς Έλληνες. Εκδότης Βουλή των Ελλήνων.

SU: Σουίδας (ελληνικό λεξικό 10^{ου} αιώνα).

TH: Theophrastus; Wimmer, Friedrich, 1854-1862. Περί φυτικῶν ἱστοριῶν (Theophrasti Eresii Opera quae supersunt omnia)

1: Gupta, S. *et al.* (2017). Draft genome sequence of *Cicer reticulatum* L., the wild progenitor of chickpea provides a resource for agronomic trait improvement. DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes, 24, 1–10.

Η λίστα αντιστοίχισης των δρογών που αναφέρονται στα *Θηριακά* με τη σύγχρονη λατινική τους ονομασία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των ανωτέρω εγχειριδίων και ως αποτέλεσμα παρατίθενται όλες οι πιθανές περιπτώσεις. Επίσης για την αναγνώριση όλων των δρογών λήφθηκαν υπόψη τα βιβλία *Nicander, the poems and poetical fragments* (Gow, A.S.F. & Scholfield, A.F., 1953), *Τα δημώδη ονόματα των φυτών προσδιοριζόμενα επιστημονικώς* (Heldreich, Theodor von, 1925), *The elements of materia medica and therapeutics* (Pereira Jonathan, 1842) και η ιστοσελίδα <https://uses.plantnet-project.org> (Noms grecs de Théophraste και Dioscoride) στην οποία έγινε αναζήτηση των ειδών στα κείμενα Θεοφράστου και Διοσκουρίδη. Τα λατινικά ονόματα και οι συνωνυμίες έχουν καταγραφεί με βάση την ιστοσελίδα The Plant List.

5 Οι φυτικές δρόγες του Ιερόπαιδα

Πίνακας 2. Οι φυτικές δρόγες του Ιερόπαιδα

	Αναφορά Ιερόπαιδα	Λατινική ονομασία	Οικογένεια	Οδός χορήγησης	Θεραπευτική ένδειξη	Διοσκουρίδης
1	Αδιάντον	<i>Adiantum capillus-veneris</i> L.	Pteridaceae	<i>per os</i>	σπίλοι	-
2	αιζώου χυλός	<i>Sempervivum arboreum</i> L. (αιζίων μέγα) <i>Sempervivum tectorum</i> L. (αιζίων μικρόν)	Crassulaceae	επιδερμική	καρκίνος	✓
3	αλθαία (ρίζα)	<i>Althaea officinalis</i> L.	Malvaceae	εγκαθίσματα, επιδερμική	καρκίνος, σκίρος και σκίρωμα μήτρας, φλεγμονή στήθους, χειράς	✓
4	αμάρακον (πόα χωρίς άνθος)	<i>Origanum majorana</i> L.	Lamiaceae	επιδερμική	καρκίνος	-
5	αμμωνιακόν (ρητίνη)	<i>Ferula tingitana</i> L. <i>Ferula communis</i> L. <i>Ferula marmarica</i> Asch. & Taub. ex Asch. & Schweinf.	Apiaceae	επιδερμική	σκληρίες, στεάτωμα, μελικηρίδες, σκίρος	✓
6	αμυγδάλινον έλαιον	<i>Prunus dulcis</i> (Mill.) D.A.Webb.	Rosaceae	-	σκίρος και σκίρωμα μήτρας, σκίρος	✓
7	Ανδράχνη	<i>Portulaca oleracea</i> L.	Portulacaceae	επιδερμική	φλεγμονή μαστών	✓
8	Απαρίνη	<i>Galium aparine</i> L.	Rubiaceae	επιδερμική	έλκη στήθους, χειράς	-
9	αριστολοχίας ρίζα	<i>Aristolochia</i> sp.	Aristolochiaceae	επιδερμική	άνθρακας	✓
10	αρνόγλωσσον (φύλλα)	<i>Plantago lagopus</i> L. <i>Plantago major</i> L.	Plantaginaceae	κατάπλασμα	φλεγμονή, άνθρακας, καρκίνος μήτρας	✓

	Αναφορά Ιερόπαιδα	Λατινική ονομασία	Οικογένεια	Οδός χορήγησης	Θεραπευτική ένδειξη	Διοσκουρίδης
				<i>per os</i> (χυλός)		
11	αρτεμησία (ρίζα)	<i>Artemisia</i> sp. <i>Artemisia arborescens</i> (Vaill.) L.	Compositae	εγκαθίσματα	σκίρος και σκίρωμα μήτρας, χειράς	✓
12	ασκληπιάς (ρίζα)	<i>Asclepias vincetoxicum</i> L.	Apocynaceae	επιδερμική	έλκη στήθους	✓
13	ασφόδελος (ρίζα, φύλλα)	<i>Asphodelus</i> sp. <i>Asphodelus ramosus</i> L.	Xanthorrhoeaceae	επιδερμική	φλεγμονή μαστών	✓
14	Αψίνθιον	<i>Artemisia absinthium</i> L.	Compositae	επιδερμική	σκίρος και σκίρωμα μήτρας	-
15	Βδέλλιον	<i>Commiphora africana</i> (A.Rich.) Endl.	Burseraceae	επιδερμική	στεάτωμα, μελικηρίδες, σκίρος και σκίρωμα μήτρας, σκίρος	✓
16	Βούφθαλμον	<i>Glebionis coronaria</i> (L.) Cass. ex Spach (syn. <i>Chrysanthemum coronarium</i> L.) <i>Anacyclus radiatus</i> Loisel.	Asteraceae	επιδερμική	καρκίνος	✓
17	Βρυωνία	<i>Bryonia cretica</i> L. <i>Bryonia cretica</i> subsp. <i>dioica</i> (Jacq.) Tutin	Cucurbitaceae	επιδερμική	καρκίνος	-
18	Γαλίοψις	<i>Scrophularia peregrina</i> L.	Scrophulariaceae	επιδερμική	καρκίνος, χειράς	✓
19	Γλήχων	<i>Mentha pulegium</i> L.	Lamiaceae	εγκαθίσματα	σκίρος και σκίρωμα μήτρας	✓
20	δρακοντίας ρίζα	<i>Dracunculus vulgaris</i> Schott (δρακοντία μεγάλη)	Araceae	επιδερμική	άνθρακας, σκίρος	✓
21	ελλέβορος	<i>Veratrum album</i> L. (ελλέβορος λευκός)	Melanthiaceae Ranunculaceae	επιδερμική	στεάτωμα, μελικηρίδες	✓

	Αναφορά Ιερόπαιδα	Λατινική ονομασία	Οικογένεια	Οδός χορήγησης	Θεραπευτική ένδειξη	Διοσκουρίδης
		<i>Helleborus niger</i> L., <i>Helleborus cyclophyllus</i> Boiss. (ελλέβορος μέλας)				
22	Ελξίνη	<i>Parietaria officinalis</i> L. (syn. <i>Helxine dioscoridis</i> Bubani) <i>Parietaria judaica</i> L.	Urticaceae	επιδερμική	καρκίνος	✓
23	επιθύμον (επίθυμον)	<i>Cuscuta epithymum</i> (L.) L.	Convolvulaceae	per os	καρκίνος	✓
24	ερύσιμον (σπέρμα)	<i>Sisymbrium officinale</i> (L.) Scop. <i>Sisymbrium irio</i> L. <i>Sisymbrium polyceratium</i> L. (syn. <i>Erysimum polyceratium</i> (L.) Link) <i>Erysimum graecum</i> Boiss. & Heldr.	Brassicaceae	-	καρκίνος	✓
25	Εφήμερον	<i>Polygonatum multiflorum</i> (L.) All. <i>Polygonatum verticillatum</i> (L.) All	Asparagaceae	επιδερμική	καρκίνος	✓
26	Ηδύοσμον	<i>Mentha</i> sp. <i>Mentha x piperita</i> L. <i>Mentha spicata</i> L.	Lamiaceae	επιδερμική	καρκίνος, χειράς	-
27	ημεροκαλλίδος (ρίζα)	<i>Lilium martagon</i> L.	Liliaceae	επιδερμική	φλεγμονή μαστών	✓
28	θρίδαξ (θριδακίνη)	<i>Lactuca sativa</i> L.	Asteraceae	επιδερμική	καρκίνος	-
29	ίρις ιλλυρική	<i>Iris x germanica</i> L. (syn. <i>Iris x</i> <i>florentina</i> L.)	Iridaceae	εγκαθίσματα επιδερμική	σκίρος και σκίρωμα μήτρας χειράς	✓

	Αναφορά Ιερόπαιδα	Λατινική ονομασία	Οικογένεια	Οδός χορήγησης	Θεραπευτική ένδειξη	Διοσκουρίδης
30	Κάγκαμον	<i>Commiphora kataf</i> (Forssk.) Engl.	Burseraceae	<i>per os</i>	σπίλοι	-
31	κάππαρις (ρίζα και φύλλα)	<i>Capparis spinosa</i> L.	Capparaceae	επιδερμική	σκληρίες	✓
32	Κνίδη	<i>Urtica</i> sp. <i>Urtica dioica</i> L. <i>Urtica urens</i> L., <i>Urtica pilulifera</i> L.	Urticaceae	επιδερμική	καρκίνος	✓
33	κράμβη (φύλλα)	<i>Brassica oleracea</i> L. (κράμβη ήμερος) <i>Brassica cretica</i> Lam. (κράμβη αγρία)	Brassicaceae	επιδερμική	καρκίνος άνθρακας	✓
34	κρίνου ρίζα	<i>Lilium candidum</i> L.	Liliaceae	επιδερμική	άνθρακας, σκίρος και σκίρωμα μήτρας	✓
35	Κυδώνια	<i>Cydonia oblonga</i> Mill.	Rosaceae	επιδερμική	φλεγμονή μαστών	-
36	κυπαρίσου φύλλα συν βλαστοίς	<i>Cupressus sempervirens</i> L.	Cupressaceae	επιδερμική	άνθρακας	✓
37	Λάδανος	<i>Cistus creticus</i> L.	Cistaceae	επιδερμική	στεάτωμα, μελικηρίδες, σκίρος και σκίρωμα μήτρας	✓
38	Λάπαθον	<i>Rumex</i> sp. <i>Rumex conglomeratus</i> Murray <i>Rumex crispus</i> L. <i>Rumex patientia</i> L.	Polygonaceae	επιδερμική	στεάτωμα, μελικηρίδες, χειράς	✓
39	Λίβανος	<i>Boswellia serrata</i> Roxb. ex Colebr.	Burseraceae	επιδερμική	καρκίνος μήτρας	✓
40	Λινόσπερμα	<i>Linum usitatissimum</i> L., <i>Linum bienne</i> Mill.	Linaceae	επιδερμική	καρκίνος, άνθρακας, σκληρίες, σκίρος	✓

	Αναφορά Ιερόπαιδα	Λατινική ονομασία	Οικογένεια	Οδός χορήγησης	Θεραπευτική ένδειξη	Διοσκουρίδης
41	λουπίνων άλευρον	<i>Lupinus albus</i> L.	Fabaceae	επιδερμική	φλεγμονή	✓
42	Μαλάχη	<i>Malva sylvestris</i> L.	Malvaceae	επιδερμική, εγκαθίσματα	καρκίνος μήτρας	-
43	Μελίλωτον	<i>Melilotus officinalis</i> (L.) Pall.	Fabaceae	επιδερμική	καρκίνος μήτρας, στεάτωμα, μελικηρίδες	✓
44	μελισσόφυλλον	<i>Melissa officinalis</i> L.	Lamiaceae	-	χειράς	✓
45	μυρσίνιον έλαιο	<i>Myrtus communis</i> L.	Myrtaceae	επιδερμική	καρκινώδη διάθεση μαστών	✓
46	νάπιος σπέρματα	<i>Brassica napus</i> L. <i>Sinapis alba</i> L. (σίναπι)	Brassicaceae	per os	σπίλοι, άνθρακας, χειράς	✓
47	Νάρδος	<i>Nardostachys jatamansi</i> (D.Don) DC	Caprifoliaceae	πεσσός μαλακτικός	γυναικεία καρκινώματα	✓
48	Νάρκισσος	<i>Narcissus pseudonarcissus</i> L. (syn. <i>Narcissus sylvestris</i> Lam.) <i>Narcissus poeticus</i> L.	Amaryllidaceae	επιδερμική	καρκίνος	✓
49	ομφάκινον έλαιο	<i>Olea europaea</i> L.	Oleaceae	επιδερμική	καρκίνος	✓
50	Όπιον	<i>Papaver somniferum</i> L.	Papaveracea	πεσσός	καρκίνος μήτρας	-
51	Οποπάναξ	<i>Oporanax hispidus</i> (Friv.) Griseb.	Apiaceae	επιδερμική	σκίρος	-
52	όροβος (ορόβων άλευρον)	<i>Vicia ervilia</i> (L.) Willd.	Fabaceae	επιδερμική	άνθρακας, σκληρία μαστών	✓
53	Όρυζα	<i>Oryza sativa</i> L.	Poaceae	επιδερμική	φλεγμονή μαστών	-
54	παρθένιον	<i>Chrysanthemum parthenium</i> (L.) Bernh. (syn. <i>Tanacetum parthenium</i> (L.) Sch. Bip.,	Asteraceae	-	σκίρος και σκίρωμα μήτρας	✓

	Αναφορά Ιερόπαιδα	Λατινική ονομασία	Οικογένεια	Οδός χορήγησης	Θεραπευτική ένδειξη	Δισκουρίδης
		<i>Pyrethrum parthenium</i> (L.) Sm.)				
55	Πέπερι	<i>Piper nigrum</i> L., <i>Piper album</i> Vahl, <i>Piper longum</i> L.	Piperaceae	επιδερμική	χειράς	✓
56	Πήγανον	<i>Ruta graveolens</i> L.	Rutaceae	επιδερμική	καρκίνος μήτρας, στεάτωμα, μελικηρίδες, φλεγμονή μαστών	✓
57	Πολύγονον	<i>Polygonum aviculare</i> L. (πολύγονον άρρεν)	Polygonaceae	επιδερμική <i>per os</i>	καρκίνος καρκίνος μήτρας	✓
58	Πράσον	<i>Allium ampeloprasum</i> L.	Amaryllidaceae	επιδερμική	άνθρακας	✓
59	Πυκνόκομον	<i>Leonurus cardiaca</i> L. <i>Leonurus marrubiastrum</i> L. <i>Valeriana tuberosa</i> L.	Lamiaceae Caprifoliaceae	επιδερμική	καρκίνος	✓
60	ρόδιον έλαιον	<i>Rosa</i> sp. <i>Rosa centifolia</i> L.	Rosaceae	επιδερμική	καρκίνος	✓
61	σησάμιον έλαιον	<i>Sesamum indicum</i> L.	Pedaliaceae	-	σκίρος και σκίρωμα μήτρας, σκίρος	-
62	σμύρνιον (ρίζα)	<i>Smyrnum perfoliatum</i> L.	Apiaceae	επιδερμική	σκληρίες	✓
63	Σταφίς	<i>Delphinium staphisagria</i> L.	Ranunculaceae	επιδερμική	στεάτωμα, μελικηρίδες, άνθρακας	✓
64	Σταφυλή	<i>Vitis vinifera</i> L.	Vitaceae	επιδερμική	σκληρία μαστών	✓
65	στρύχνος (χυλός)	<i>Solanum nigrum</i> L. (στρύχνος κηπαίος)	Solanaceae	επιδερμική	καρκίνος	✓
66	Στύραξ	<i>Styrax officinalis</i> L.	Styracaceae	επιδερμική	σκίρος, σκίρος και σκίρωμα μήτρας	✓
67	Τερεβινθίνη	<i>Pistacia terebinthus</i> L.	Anacardiaceae	εγκαθίσματα, πεσσός, μαλακτικός	σκίρος και σκίρωμα μήτρας, γυναικεία καρκινώματα, στεάτωμα, μελικηρίδες	-
68	τήλις (σπέρμα)	<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	Fabaceae	επιδερμική, εγκαθίσματα	σκληρίες, καρκίνος, καρκίνος μήτρας	✓

	Αναφορά Ιερόπαιδα	Λατινική ονομασία	Οικογένεια	Οδός χορήγησης	Θεραπευτική ένδειξη	Διοσκουρίδης
69	υοσκάμος (έλαιο σπερμάτων)	<i>Hyoscyamus</i> sp., <i>Hyoscyamus niger</i> L.	Solanaceae	επιδερμική	φλεγμονή μαστών, χειράς	✓
70	Ύσσωπος	<i>Micromeria graeca</i> (L.) Benth. ex Rchb. (syn. <i>Satureja graeca</i> L.) <i>Hyssopus officinalis</i> L.	Lamiaceae	επιδερμική, εγκαθίσματα, πεσσός μαλακτικός	καρκίνος μήτρας, σκίρος και σκίρωμα μήτρας, γυναικεία καρκινώματα	-
71	φακός ο επί των τελμάτων	<i>Lemna minor</i> L.	Araceae	επιδερμική	φλεγμονή μαστών	✓
72	Χαλβάνη	<i>Ferula galbaniflua</i> Boiss. & Buhse <i>Ferulago galbaniflora</i> (Mill.) W.D.J. Koch <i>Ferula rubricaulis</i> Boiss.	Apiaceae	επιδερμική	χειράς, σκίρος, στεάτωμα, μελικηρίδες	✓
73	Χαμαιπίτυς	<i>Ajuga</i> sp., <i>Ajuga chamaepitys</i> (L.) Schreb., <i>Ajuga iva</i> (L.) Schreb.	Lamiaceae	επιδερμική	σκληρία μαστών	✓
74	Ψύλλιον	<i>Plantago afra</i> L. <i>Plantago indica</i> L. (syn. <i>Plantago psyllium</i> L.)	Plantaginaceae	επιδερμική	καρκίνος	✓

Με τη σύντμηση *syn.* σημειώνονται τα συνώνυμα είδη.

Σύμφωνα με τον Ιερόπαιδα:

Καρκίνος: "...εκ μελαίνης χολής ζεούσης συνίσταται και εί δριμύτης τύχη μεθ' ελκώσεως απόλλυται..." (Αρχή του κγ^{ου} τμήματος. Περί των εκτός του σώματος γινομένων παθών ήτοι περί των παρά φύσιν όγκων. ΚΕΦΑΛΑΙΟΝ ΙΒ^{ον}. Περί καρκίνου)

Χειράς: "...σαρξ σκληρά και δύσλυτος κατά τον τράχηλον και άλλοις μέρεσι..." (πιθανώς καλοήθεια) (Αρχή του κγ^{ου} τμήματος. Περί των εκτός του σώματος γινομένων παθών ήτοι περί των παρά φύσιν όγκων. ΚΕΦΑΛΑΙΟΝ Η^{ον}. Περί χειράδων ήτοι χελώνια)

Σκίρος: "...όγκος εστί παρά φύσιν αναίσθητος τε και σκληρός. Ο δε ούκ ακριβής δυσαίσθητος. Γίνεται από παχέος και γλίσχρου χυμού δυσλύτως εμπλαττομένου τοις σκιρουμένοις μορίοις..." (πιθανώς καλοήθεια) (Αρχή του κγ^{ου} τμήματος. Περί των εκτός του σώματος γινομένων παθών ήτοι περί των παρά φύσιν όγκων. ΚΕΦΑΛΑΙΟΝ ΙΑ^{ον}. Περί σκίρου)

Σκίρος και σκίρωμα μήτρας: "...Σκιρούται η μήτρα φλεγμονής προηγησαμένης τα πολλά. Το δε σκίρωμα περί τον τράχηλον της μήτρας συνίσταται. Εστί δε όγκος μετά αλγήματος συμμέτρου και παρεγκλίσεως επί τα αντικείμενα..." (ΚΕΦΑΛΑΙΟΝ ΙΒ^{ον}: Περί σκίρου και σκιρώματος μήτρας)

Στεάτωμα: "...όγκος σκληρός περιέχων υγρόν παχύ..." (πιθανώς καλοήθεια) (Αρχή του κγ^{ου} τμήματος. Περί των εκτός του σώματος γινομένων παθών ήτοι περί των παρά φύσιν όγκων. ΚΕΦΑΛΑΙΟΝ ΙΓ^{ον}. Περί στεατωμάτων και μελικηρίδων)

Μελικηρίδες: "...έχουσα πολλές τρύπας, εξ ών απορρεί υγρόν όμοιον μέλιτι..." (πιθανώς καλοήθεια) (Αρχή του κγ^{ου} τμήματος. Περί των εκτός του σώματος γινομένων παθών ήτοι περί των παρά φύσιν όγκων. ΚΕΦΑΛΑΙΟΝ ΙΓ^{ον}. Περί στεατωμάτων και μελικηρίδων)

Άνθρακας: "...εστί όταν αίμα μέλαν και λευκόν επιρρεύση κατά τι μόριον και εσχαρώδες έλκος επιτελέση ως τα πολλά μεν από φλυκταίνης αρχόμενος..." (πιθανώς μη κακοήθεια) (Αρχή του κγ^{ου} τμήματος. Περί των εκτός του σώματος γινομένων παθών ήτοι περί των παρά φύσιν όγκων. ΚΕΦΑΛΑΙΟΝ Β^{ον}. Περί άνθρακος)

Σπίλοι: Αρχή του κζ^{ου} τμήματος. Περί των περί την επιφάνειαν του δέρματος παθών. ΚΕΦΑΛΑΙΟΝ Α^{ον}. Περί εξανθημάτων ήτοι προς σπίλους τους εν τω προσώπω.

Φλεγμονή μαστών: Αρχή του ιγ^{ου} τμήματος. ΚΕΦΑΛΑΙΟΝ Δ^{ον} Προς μαστών φλεγμονάς

Σκληρία μαστών: Αρχή του ιγ^{ου} τμήματος. ΚΕΦΑΛΑΙΟΝ Ε^{ον} Προς σκληρίαν μαστών

Ως φαρμακοτεχνικές μορφές επιδερμικής χρήσης εφαρμόζονταν τα καταπλάσματα ή οι αλοιφές.

Η αντιστοιχισή των αναφερόμενων από τον Ιερόπαιδα φυτικών ειδών με τη σύγχρονη λατινική τους ονομασία πραγματοποιήθηκε με βάση τη λίστα των φυτικών δρογών των *Θηριακών* και κυρίως με τις εξής πηγές:

- Valiakos, E., Marselos, M., Sakellariadis, N., Constantinidis, Th., Skaltsa, H., 2015. Ethnopharmacological approach to the herbal medicines of the "Antidotes" in Nikolaos Myrepsos' *Dynameron*. *Journal of Ethnopharmacology* 163, 68-82.
- Δημητράκος, Δ., 1966. Μέγα Λεξικόν της Ελληνικής Γλώσσης. Δομή, Αθήνα.
- Ιστοσελίδα <https://uses.plantnet-project.org> (Dioscoride)

Στον πίνακα παρουσιάζονται τα φυτικά είδη όπως έχουν καταγραφεί από τον Ιερόπαιδα, το τμήμα του φυτού που φέρει τη δράση. όταν αυτό είναι γνωστό, τα σύγχρονα λατινικά ονόματα, τα οποία έχουν καταχωρηθεί με βάση την ιστοσελίδα The Plant List (<http://www.theplantlist.org>), ο τρόπος χορήγησης, οι θεραπευτικές ενδείξεις ενώ σημειώνεται με (V) όταν η δρόγη αναφέρεται και από τον Διοσκουρίδη με την ίδια ένδειξη. Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν έγινε διάκριση των δρογών με βάση τον καταγραφόμενο τύπο υπερπλασίας δηλαδή με το αν πρόκειται για καλοήθεια ή κακοήθεια προκειμένου να μην υπάρξει απώλεια πληροφορίας π.χ. παρουσιάζονται δρόγες που χρησιμοποιούνταν σε φλεγμονές (Αρχή του κγ^{ου} τμήματος. Περί των εκτός του σώματος γινομένων παθών ήτοι περί των παρά φύσιν όγκων. ΚΕΦΑΛΑΙΟΝ Α^{ον}. Περί φλεγμονής). Τέλος επισημαίνεται ότι το κάθε φυτικό είδος αποτελεί μέρος μιας απλής θεραπευτικής συνταγής ή ένα από τα βότανα μιας πιο περίπλοκης συνταγής.

6 Φαρμακολογικοί Στόχοι

6.1 Δηλητήριο ερπετών και άλλων ζωικών οργανισμών – Δράσεις - Τρόποι αντιμετώπισης

6.1.1 Γενικά



Εικόνα 20. Ένδειξη δηλητηρίου

Ως δηλητήριο ορίζεται κάθε ουσία, οργανική ή ανόργανη, η οποία εισερχόμενη σε έναν ζώντα οργανισμό με οποιονδήποτε τρόπο, προκαλεί ανεπιθύμητες ενέργειες που αφορούν την παροδική διαταραχή ή την οριστική κατάλυση λειτουργιών του οργανισμού με αποτέλεσμα την νόσηση ή το θάνατο (Κουτσελίνης, Α., 2004, Τοξικολογία. Εκδόσεις Παρισιάνου). Η ισχύς ενός δηλητηρίου καλείται τοξικότητα κι αυτή καθορίζει τη βαρύτητα των βλαβών που αυτό προκαλεί, σε συνδυασμό με την προσλαμβανόμενη ποσότητα του δηλητηρίου.

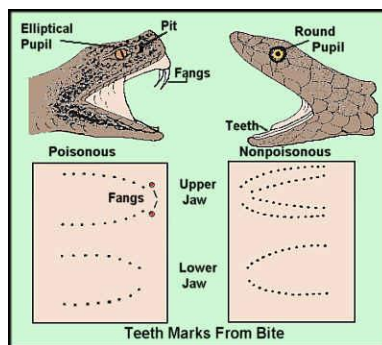
Πολλοί οργανισμοί του ζωικού βασιλείου παράγουν χημικές ουσίες οι οποίες είναι τοξικές όχι μόνο για άλλα είδη αλλά και για το ίδιο το ζώο. Οι ουσίες αυτές άλλοτε αποτελούν παραπροϊόντα του μεταβολισμού του ζωικού οργανισμού και άλλοτε έχουν ως σκοπό την άμυνα, ή και την σύλληψη και πέψη της τροφής του. Τα δηλητηριώδη ζώα διαβιβάζουν το δηλητηριό τους με δήγμα ή δάγκωμα.

Οι επιπτώσεις σε περίπτωση δηλητηρίασης από δάγκωμα φιδιού, σκορπιού ή αραχνοειδούς διαφέρουν ανάλογα με το ζώο και ποικίλλουν από ερεθιστικές (φλεγμονή και φλύκταινες στο δέρμα) και νευροτοξικές (επίδραση στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) και στις νευρομυικές μεταβιβάσεις) έως αιμολυτικές (αιμόλυση και νέκρωση ιστών) και αιμορραγικές (διαταραχές πήξης του αίματος).

6.1.2 Δηλητήριο οφιοειδών

Παγκοσμίως από τα 4.000 είδη φιδιών μόνο το 10% είναι δηλητηριώδη. Ανά έτος συμβαίνουν 2.5 εκατομμύρια ατυχήματα από δήγματα φιδιών και 2.5% αυτών έχουν θανατηφόρα έκβαση (85.000-125.000) ενώ περισσότεροι από 100.000 άνθρωποι αντιμετωπίζουν σοβαρές επιπλοκές που μπορεί να περιλαμβάνουν μέχρι και ακρωτηριασμό του

προσβαλλόμενου μέλους. Η πιθανότητα θανάτου σε περίπτωση δήγματος από έχιδνα είναι 1%, από κόμπρα 32% και από μαύρη μάμπα 100%. Πρέπει να αναφερθεί η αδυναμία εξαγωγής ασφαλών στατιστικών συμπερασμάτων μιας και τα επιδημιολογικά στοιχεία είναι ελλιπή λόγω εμφάνισης της ασθένειας κυρίως σε αναπτυσσόμενες χώρες. Στην Ελλάδα, από τα περίπου 70 είδη ερπετών που μπορεί να συναντήσει κανείς, μόνο 7 φέρουν δηλητήριο και είναι όλα τους είδη φιδιών. Τα 5 ανήκουν στην οικογένεια των Εχιδνιδών (Οχιές) και είναι σωληνόγλυφα με σχετικά ισχυρό δηλητήριο, ενώ τα άλλα 2 ανήκουν στην οικογένεια των Κολουβρίδων (σαπίτης (*Malpolon insignitus*), αγιόφιδο (*Telescopus fallax*)) και είναι οπισθόγλυφα με ασθενές δηλητήριο, ακίνδυνα για τον άνθρωπο. Τα σωληνόγλυφα φίδια φέρουν εκατέρωθεν της άνω γνάθου δηλητηριώδεις αδένες οι οποίοι επικοινωνούν με ειδικά δόντια τα οποία είναι μεγαλύτερα από τα υπόλοιπα, είναι τοποθετημένα μπροστά και είναι κινητά (Εικόνα 21). Κατά την εφαρμογή πίεσης εξαναγκάζεται η εκροή του δηλητηρίου διαμέσου αυτών των κυνοδόντων προς το θύμα. Στην Ελλάδα, τα σημαντικότερα δηλητηριώδη σωληνόγλυφα φίδια είναι δύο είδη οχιάς, η *Vipera ammodytes* (κοινή οχιά) και η *Vipera aspis*. Η πρώτη έχει τη φήμη της πιο δηλητηριώδους ευρωπαϊκής οχιάς λόγω του μεγάλου μεγέθους της, του μήκους των δοντιών της (μέχρι 13 mm) και του υψηλής τοξικότητας δηλητηρίου της. Δήγματα που προέρχονται από το δεύτερο είδος οχιάς μπορούν να είναι πολύ σοβαρά καθώς όχι μόνο προκαλούν έντονο πόνο αλλά και ένα ποσοστό, περίπου 4%, των δηλητηριάσεων που δεν αντιμετωπίζονται άμεσα αποβαίνουν θανατηφόρες. Τα οπισθόγλυφα φίδια εγχέουν το δηλητήριο τους διαμέσου οδόντων που είναι μικρότεροι από τους παραπάνω, δεν είναι κινητοί και βρίσκονται στο πίσω μέρος της οδοντοστοιχίας. Γενικά τα δήγματά τους δεν θεωρούνται θανατηφόρα για τον άνθρωπο καθώς το δηλητηριό τους είναι ήπιας τοξικότητας και τα δόντια τους βρίσκονται αρκετά πίσω ώστε καθίσταται δύσκολο να δαγκώσουν κάποιο άλλο σημείο πέρα από δάχτυλα. Πρέπει να τονισθεί ότι τα φίδια δαγκώνουν μόνο όταν αντιμετωπίζουν μεγάλο κίνδυνο, μη εγχύοντας πάντα δηλητήριο. Το 50% όλων των αμυντικών δηγμάτων δεν είναι δηλητηριώδη²⁹.



Εικόνα 21. Το δάγκωμα δηλητηριώδους φιδιού (π.χ. οχιά) αφήνει δύο μικρές οπές ενώ αν προέρχεται από μη δηλητηριώδες είδος στο σημείο του δήγματος εμφανίζεται το αποτύπωμα μιας σειράς δοντιών σε σχήμα ανάποδου U

Το δηλητήριο είναι ένα παχύρρευστο υγρό του οποίου η σύσταση έχει μελετηθεί εκτενώς χωρίς όμως να έχει εξακριβωθεί πλήρως. Τα περιεχόμενα συστατικά του μάλιστα δύνανται να ποικίλουν ανάλογα με τη ηλικία και το φύλο του ζώου, τη διατροφή του, τις περιβαλλοντικές συνθήκες και την εποχή του έτους. Οι μελέτες που έχουν διεξαχθεί μέχρι σήμερα δείχνουν ότι το δηλητήριο των όφεων αποτελείται από ένα μείγμα αιμολυσινών, πρωτεολυσινών και νευροτοξινών, αφού οι δράσεις αφορούν κατά κύριο λόγο το αίμα και το νευρικό σύστημα. Περιέχονται επίσης λιπίδια, αμίνες, νουκλεοτίδια, ανόργανα ιόντα και ουσίες χαμηλού μοριακού βάρους όπως είναι η ισταμίνη. Στο δηλητήριο των φιδιών υπάρχουν διάφορες τοξίνες, οι οποίες αποτελούνται από πεπτιδία με έως 74 αμινοξέα. Όπως αναφέρθηκε αυτές έχουν κυρίως νευροτοξική δράση, προκαλούν συστηματικές βλάβες, κάνουν δυνατή την ταχεία παράλυση του θύματος ενώ μπορεί να οδηγήσουν στο θάνατο. Οι τοξίνες των δηλητηριωδών εχιδνών αποκλείουν τους υποδοχείς της ακετυλοχολίνης στη νευρομυϊκή σύναψη και οδηγούν κατ' αυτόν τον τρόπο στη γρήγορη παράλυση. Οι τοξίνες των όφεων διαφέρουν σημαντικά ανάλογα με την δράση τους, αν και μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τις νευροτοξίνες και τις αιμοτοξίνες³⁰. Οι νευροτοξίνες περιλαμβάνουν τις α-νευροτοξίνες (δρουν ως ανταγωνιστές στους μετασυναπτικούς χολινεργικούς υποδοχείς), τις β-νευροτοξίνες (δρουν προσυναπτικά και επηρεάζουν την έκκριση της ακετυλοχολίνης) και τις δένδροτοξίνες (είναι ανταγωνιστές διαύλων καλίου). Οι αιμοτοξίνες περιλαμβάνουν τις τοξίνες που μειώνουν τη πήξη του αίματος και προκαλούν εκτεταμένες αιμορραγίες, τοξίνες που προκαλούν αιμορραγία λόγω της καταστροφής των αγγείων και τοξίνες που προκαλούν θρόμβωση. Άλλες κατηγορίες τοξινών είναι οι καρδιοτοξίνες που προκαλούν καρδιακή ανακοπή και οι μυοτοξίνες που προκαλούν εκφυλισμό των σκελετικών μυών. Επίσης μέχρι τώρα έχουν απομονωθεί περίπου 30 διαφορετικά ένζυμα με διαφορετικές δράσεις. Πολλά από αυτά τα

ένζυμα βρίσκονται σε όλα τα δηλητήρια ενώ κάποια από αυτά εμφανίζονται σε συγκεκριμένες υποοικογένειες έχοντας ταξινομική σημασία. Για παράδειγμα το δηλητήριο της οικογένειας Elapidae χαρακτηρίζεται από τη παρουσία ακετυλοχολινεστεράσης ενώ το συγκεκριμένο ένζυμο απουσιάζει από την οικογένεια Viperidae. Μερικά από τα κύρια ένζυμα που έχουν απομονωθεί φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3). Συνήθως είναι πρωτεολυτικά ένζυμα (αποδομούν πρωτεΐνες και οδηγούν σε βαρείες νεκρώσεις, με αποτέλεσμα να μην αιματώνεται σωστά το δέρμα). Επίσης είναι δυνατόν να αποδομουν νουκλεϊνικές βάσεις π.χ. DNA και διαβιβαστές ενέργειας ATP και συνεπώς να δρουν κυτταροτοξικά. Κολλαγενάσες και υαλουρονιδάσες βλάπτουν τους ιστούς και κάνουν δυνατή τη ραγδαία είσοδο του δηλητηρίου στο σώμα³¹. Ουσιαστικά αυτοί οι παράγοντες που διευκολύνουν τη διασπορά των τοξινών στην κυκλοφορία είναι υπεύθυνοι για τις ακόλουθες επιδράσεις της δηλητηρίασης: αυτόματη αιμορραγία – η εγκεφαλική αιμορραγία είναι η πιο σοβαρή εκδήλωση, εκτεταμένη ενδοαγγειακή πήξη και καρδιαγγειακό σοκ (καταπληξία) ως επίπτωση υποογκαιμίας, αγγειοδιαστολής και άμεσες συνέπειες στο μυοκάρδιο και οξεία αναπνευστική δυσχέρεια. Η φωσφολιπάση A₂ υδρολύει φωσφολιπίδια με πολλαπλές επιδράσεις. Μερικά δηλητήρια π.χ. εχιδνών περιέχουν και ένζυμο πήξης, τα οποία επηρεάζουν την πήξη του αίματος. Συνεπώς η παθολογία της δηλητηρίασης από δήγμα φιδιού αποτελείται τόσο από συστηματικές όσο και από τοπικές επιδράσεις. Για το λόγο αυτό πιστεύεται ότι η αναστολή αυτών των ενζύμων είναι σημαντική συμπληρωματική θεραπεία για τη διαχείριση της δηλητηρίασης από οφιοειδή και συγκεκριμένα για τη μείωση των περιφερικών επιπτώσεων, καθώς έτσι όχι μόνο μπορεί να αποτραπεί η καταστροφή του τοπικού ιστού δηλαδή να περιοριστεί η αιμορραγία, το οίδημα, η νέκρωση και η φλεγμονή στο σημείο του δήγματος αλλά να καθυστερήσει η διασπορά των τοξινών που είναι δυνατόν να επιφέρουν το θάνατο του θύματος³². Ενδεικτικά αναφέρεται ότι φίδια της οικογένειας Viperidae (π.χ. οχιά, κροταλιάς) διαθέτουν δηλητήρια που περιέχουν αιμοτοξίνες οι οποίες μπορούν να διαταράξουν την πήξη του αίματος, τη διαδικασία της αιμόστασης και την ακεραιότητα των ιστών. Μεταλλοπρωτεϊνάσες και άλλες ουσίες, συνήθεις στο δηλητήριο οχιάς και των φιδιών της οικογένειας των Colubridae, εμφανίζουν αντιπηκτική ή προ-πηκτική δράση και είναι δυνατό να οδηγήσουν σε ισχαιμικό ή αιμορραγικό εγκεφαλικό επεισόδιο. Αντίθετα, στην οικογένεια Elapidae (κόμπρα, κοραλόφιδο - coral snake, μαύρη μάμπα), υπάρχουν νευροτοξίνες που δρουν κυρίως στο περιφερικό νευρικό σύστημα, και συγκεκριμένα στις νευρομυϊκές συνάψεις είτε σε προσυναπτικό είτε σε μετασυναπτικό επίπεδο. Περιέχουν επίσης υαλουρονιδάση, πρωτεάσες του πλάσματος, φωσφολιπάση A₂, ακετυλοχολινεστεράση^{33 34 35 36}.

Πίνακας 3. Ένζυμα που έχουν απομονωθεί από το δηλητήριο των φιδιών

Όνομα ενζύμου	Προέλευση	Παθολογικές δράσεις
Φωσφολιπάση A ₂	Όλα τα δηλητήρια	Αιμόλυση διαρρηγνύοντας τη φωσφολιπιδική μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων
Φωσφοδιεστεράση	Όλα τα δηλητήρια	Στο καρδιαγγειακό συστημα: πτώση της πίεσης
L-Αμινοξυ οξειδάση	Όλα τα δηλητήρια	Βοηθά στην πέψη του θύματος
Υαλουρονιδάση	Όλα τα δηλητήρια	Αύξηση της διαπερατότητας του δέρματος προκαλώντας λύση του
Ενδοπεπτιδάση	Viperidae, Crotalinae	Βοηθά στη πέψη του θύματος
Κινογενάση	Viperidae	Οίδημα και πόνος
Ενεργοποιητής του παράγοντα X	Viperidae, Crotalinae	Προκαλεί πήξη του αίματος
Ακετυλοχολινεστεράση	Elapidae	Νευρομυϊκή αδυναμία
Φωσφολιπάση B	Elapidae	Αιμόλυση διαρρηγνύοντας τη φωσφολιπιδική μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων

Η συμπτωματολογία σε περίπτωση δήγματος από φίδι διαφέρει ανάλογα με το ζώο, αν και οι επιδράσεις εμφανίζονται στα εξής τρία συστήματα: στο κεντρικό νευρικό, στο καρδιαγγειακό και στο μυϊκό. Οι επιπτώσεις που μπορεί να έχει μια τέτοια δηλητηρίαση είναι χαλαρή παράλυση (απώλεια των αντανακλαστικών και του τόνου), συστηματική μυόλυση, αιμορραγία και διαταραχή της πήξης, νεφρική ανεπάρκεια και βλάβη, καρδιοτοξικότητα, και τοπική βλάβη ιστού στο σημείο του δήγματος. Γενικά, στο αίμα το δηλητήριο προκαλεί αιμόλυση (αιμορραγίες από τους νεφρούς, τα ότια, τη μύτη, το δέρμα και το γαστρεντερικό), στο ΚΝΣ εμφανίζονται διαταραχές του κυκλοφορικού συστήματος εξαιτίας της επίδρασης στο

αγγειοκινητικό και στο αναπνευστικό κέντρο, πιθανά συμπτώματα είναι η πρόκληση υποθερμίας, οι σπασμοί, η παράλυση, η υπνηλία, το κώμα, ακόμη και το ονειρικό παραλήρημα ενώ στο κυκλοφορικό σύστημα το δηλητήριο των εχιδνών επιφέρει αγγειοδιαστολή, ταχυκαρδία, περιφερική κυκλοφορική ανεπάρκεια. Στα τοπικά συμπτώματα περιλαμβάνονται ο σχηματισμός επώδυνης οίδηματώδους περιοχής στο σημείο του δήγματος, η οποία επεκτείνεται σταδιακά και στους γειτονικούς ιστούς. Σε περίπτωση που το δήγμα εντοπίζεται στο πρόσωπο, το οίδημα τείνει να καταλάβει το φάρυγγα και την γλωτίδα με άμεσο τον κίνδυνο πρόκλησης ασφυξίας. Η γενική συμπτωματολογία επέρχεται συνήθως μετά με την πάροδο λίγων ωρών (σπάνια εκδηλώνεται αμέσως ως γενική καταπληξία) με τη μορφή διέγερσης, δυσφορίας, κεφαλαλγίας, οίδηματος και αίσθησης ψύχους στο δέρμα, μαζί με κολλώδεις ιδρώτες, δίψα, ναυτία, επιγαστραλγία, χολώδη ή αιματηρό έμετο, εντερορραγία, αιματουρία, ολιγουρία, αιμοσφαιρινουρία. Σε περίπτωση βαρείας δηλητηρίασης παρουσιάζονται ίκτερος και αναπνευστική δυσχέρεια, παράλυση των αναπνευστικών μυών, πνευμονική συμφόρηση και επακόλουθος θάνατος. Είναι πιθανό ακόμη και μετά την ανάνηψη του θύματος να παραμείνουν ορισμένα συμπτώματα όπως ίκτερος, δυσκαμψία των αρθρώσεων, παρέσεις και παραλύσεις των άκρων, μυϊκή αδυναμία, κεφαλαλγία, κώφωση, οίδημα, γαστρεντερικές διαταραχές (χρόνιος εχιδνισμός)³⁷.

Η θεραπευτική προσέγγιση που ακολουθείται σε περίπτωση δηλητηρίασης από φίδι είναι κοινή και περιλαμβάνει τη διακοπή της περαιτέρω διάχυσης του δηλητηρίου στο οργανισμό και ακολούθως την απομάκρυνση και εξουδετέρωση του δηλητηρίου. Διατίθενται ειδικοί αντιοφικοί οροί για σχεδόν όλα τα δηλητήρια φιδιών. Ωστόσο θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο σε περιπτώσεις όπου κινδυνεύει η ζωή του θύματος μιας και κατόπιν χορήγησης του ορού (ξένη πρωτεΐνη) είναι δυνατόν να προκληθούν αλλεργικές αντιδράσεις και θανατηφόρο αναφυλακτικό σοκ (στο 0.3% των περιπτώσεων)³⁸. Για την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων χορηγούνται συμπαθομιμητικά φάρμακα, κορτικοστεροειδή, γλυκονικό ασβέστιο ενδοφλεβίως (κυρίως για την αντιμετώπιση της αιμορραγίας), διάλυμα θειικού μαγνησίου (για ανακούφιση έντονου άλγους), αντιβιοτικά, κατασταλτικοί και καρδιοτονωτικοί γλυκοσίδες (σε ενδεχόμενη κατάσταση collarsus). Αντένδειξη αποτελεί η χορήγηση μορφίνης και αλκοολούχων. Αξίζει να σημειωθεί ότι σύμφωνα με τον Παγκόσμιο οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ, WHO) η δηλητηρίαση που προέρχεται από δήγμα οφιοειδών κατατάσσεται στην κατηγορία 'παραμελημένων τροπικών ασθενειών' λόγω εντοπισμού της σε περιοχές της υπαίθρου, οι

οποίες στερούνται ισχυρής πολιτικής ηγεσίας και παρουσιάζουν σοβαρή έλλειψη συστήματος υγείας. Υπάρχουν μη κυβερνητικές οργανώσεις όπως οι γιατροί χωρίς σύνορα, η παγκόσμια πρωτοβουλία δήγματος οφιοειδών (Global Snakebite Initiative (GSI) οι οποίες δραστηριοποιούνται σε μεγάλο βαθμό γύρω από αυτού του είδους την παθολογική κατάσταση³⁹.

6.1.3 Δηλητήριο σκορπιών, αραχνοειδών, εντόμων

Στους σκορπιούς περιλαμβάνονται περίπου 1.500 είδη, από τα οποία 25 μπορούν να προκαλέσουν θανατηφόρο δήγμα στον άνθρωπο. Στο Μεξικό συμβαίνουν 100.000 ατυχήματα από τα οποία 800 έχουν θανατηφόρα έκβαση ενώ δεν απουσιάζουν αντίστοιχα περιστατικά και στην Ευρώπη. Η δηλητηρίαση από νυγμό σκορπιού αποτελεί σημαντικό πρόβλημα σε αρκετές περιοχές του πλανήτη όπως στην Βόρεια και Νότια Αφρική, Μέση Ανατολή, Νότια Ινδία, Μεξικό και Λατινική Αμερική. Οι σκορπιοί έχουν ένα κεντρί με 2 εκφορητικούς πόρους (από διπλούς δηλητηριώδεις αδένες). Στο δηλητήριο του σκορπιού περιέχονται ουσίες όπως πρωτεΐνες, νευροτοξίνες και ένζυμα μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται η υαλουρονιδάση, η ακετυλοχολινεστεράση, η φωσφολιπάση και χαμηλού μοριακού βάρους αμινοξέα, ισταμίνη και σεροτονίνη. Οι δραστηκότερες τοξίνες πολυπεπτιδίων που περιέχονται είναι νευροτοξίνες που επηρεάζουν τη μεταφορά ιόντων νατρίου στους νευρώνες και τη λειτουργία νευροδιαβιβαστών. Οι νευροτοξίνες μπορούν να προκαλέσουν στον άνθρωπο συμπτώματα όπως έμετο, υπεργλυκαιμία, υπέρταση, ταχυκαρδία και τελικά θάνατο σε περίπτωση κυκλοφορικού σοκ. Άλλες επιπτώσεις της δηλητηρίασης είναι η τοπική εμφάνιση έντονης φλεγμονής, η επώδυνη διόγκωση των παρακείμενων προς την περιοχή αδένων, γάγγραινα και λεμφαγγειίτιδα. Εμφανίζονται ακόμη συμπτώματα από τη γενική επίδραση των τοξινών σε ολόκληρο τον οργανισμό, όπως σιελόρροια, εμετοί, αιμορραγίες, διάρροια, καταπληξία, σπασμοί, παραλήρημα, πνευμονικό οίδημα, καρδιακή αρρυθμία, μυοκαρδίτιδα, εξασθένιση της καρδιάς και στα παιδιά θάνατος εντός 24 ωρών. Υπάρχουν ειδικοί αντι-οροί για τη θεραπεία αυτού του είδους δηλητηρίασης ενώ χορηγούνται καρδιοτονωτικά, κατασταλτικά, αναλγητικά, διαζεπάμη, γλυκονικό ασβέστιο (για τετανία) και τοπικά αναισθητικά^{38 40}.

Οι αράχνες περιλαμβάνουν κατά προσέγγιση 30.000 είδη από τα οποία 300 περίπου θεωρούνται επικίνδυνα για τον άνθρωπο. Ενδεικτικά αναφέρονται κάποια επικίνδυνα είδη αραχνών όπως οι αράχνες μπανάνας, οι σακοειδείς, των πτηνών, οι χωνοειδείς, οι σφαιροειδείς

και οι κυνηγητικές. Σε αδένες που υπάρχουν κυρίως στο κεφάλι και στο στήθος τους παράγεται το δηλητήριο, το οποίο διαβιβάζεται μέσω δήγματος. Η ποσότητα του δηλητηρίου μιας αράχνης είναι περίπου 0.2 mg και σε αυτό περιέχονται κυρίως πεπτίδια, πρωτεΐνες και πολυαμίνες. Το δηλητήριο των αραχνοειδών περιλαμβάνει συνήθως ακυλοπολυαμίδια, γραμμικά πεπτίδια, κυστεϊνούχες μικροπρωτεΐνες, νευροτοξικές πρωτεΐνες, ένζυμα (φωσφολιπάσες, υαλουρονιδάση, σερινοπρωτεάση), οργανικά οξέα, νουκλεοτίδια, νουκλεοσίδια, αμινοξέα, αμίνες, πολυαμίνες, αλλεργιογόνους παράγοντες και άλλες χημικές ουσίες που δρουν όμοια με τους νευροδιαβιβαστές. Δρουν σαν νευροτοξίνες ή σαν τοξίνες που δημιουργούν νεκρώσεις (νεκροτοξίνες). Η δηλητηρίαση από αραχνοειδή προκαλεί τρεις βασικές διαταραχές, οι οποίες εκδηλώνονται σε διαφορετικό βαθμό ανάλογα με το είδος που προκάλεσε το δήγμα και έτσι υπάρχουν η δηλητηρίαση από αράχνες του γένους *Latrodectus* (Latrodectism), δηλητηρίαση από αράχνες του γένους *Loxosceles* της οικογένειας Sicariidae (Loxoscelism) και δηλητηρίαση από αράχνες του γένους *Atrax* (funnel-web spider). Κύριο συστατικό του δηλητηρίου της μοναδικής επικίνδυνης αράχνης στην Ευρώπη, της 'μαύρης χήρας', είναι ένα πολυπεπτίδιο (λατροτοξίνη) με 42 αμινοξέα, το οποίο επάγει μια μαζική απελευθέρωση διαβιβαστών από συνάψεις και προκαλεί μυϊκούς σπασμούς στο θύμα. Χαρακτηριστικά είναι τα συμπτώματα που αναφέρουν τα θύματα μετά το πέρας 10-15 λεπτών από τη στιγμή του δήγματος και αυτά είναι ισχυρή ευαισθησία στο άλγος, διόγκωση των βλεφάρων και του επιπεφυκότα των ματιών και αλλοίωση του προσώπου από γκριμάτσες (μορφασμούς) (latrodectism). Σε αυτή την κατηγορία δηλητηρίασης η κλινική εικόνα περιλαμβάνει πονοκέφαλο, λήθαργο, μυϊκές συσπάσεις, μυαλγία, τρόμο και αταξία. Στην δεύτερη κατηγορία εκδηλώνεται σοβαρή διαταραχή της πήξης του αίματος η οποία είναι δυνατόν να οδηγήσει σε εγκαφαλικό επεισόδιο. Στην τρίτη κατηγορία το δηλητήριο των αραχνών του γένους *Atrax* περιέχει νευροτοξίνες που επάγουν την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών, έχοντας ως αποτέλεσμα αισθητικές διαταραχές και μυϊκή παράλυση. Οι τοπικές βλάβες που προκαλούνται περιλαμβάνουν έντονη ερυθρότητα, υποδόριο εμφύσημα και νέκρωση ιστών ενώ στις γενικές βλάβες εντοπίζονται πυρετός, ρίγος, ίκτερος, μυδρίαση, διάρροια και δυσφαγία. Και σε αυτήν την περίπτωση διατίθενται ειδικοί αντι-οροί για τη θεραπεία των ασθενών. Επίσης ενδείκνυται η χορήγηση αναλγητικών, γλυκονικού ασβεστίου, διαζεπάμης, ατροπίνης και κορτικοστεροειδών^{38 40 41}.



Εικόνα 22. Σκορπιός - *Androctonus bicolor*, Buthidae, Μαύρη χήρα - *Latrodectus Hesperus*

Τα έντομα αποτελούν, με πάνω από 1.5 εκατομμύρια είδη, την μεγαλύτερη ζωική ομάδα. Οι μέλισσες και οι σφήκες θεωρούνται τα σημαντικότερα δηλητηριώδη έντομα στην Ευρώπη. Η μέλισσα εγχύει περίπου 100 µg δηλητήριο ανά δήγμα. Ο ανθρώπινος οργανισμός θα έπρεπε να δεχθεί περίπου 1.000 δήγματα για να λάβει τη θανατηφόρα δόση. Περίπου 4% του πληθυσμού αντιδρά αλλεργικά στα δήγματα μελισσών. Στη Γερμανία συμβαίνουν περίπου 10 θάνατοι ανά έτος από προκληθείσες αναφυλακτικές αντιδράσεις μετά από δήγμα. Το δηλητήριο της μέλισσας έχει μελετηθεί περισσότερο από όλα τα άλλα. Περιέχει ντοπαμίνη, ισταμίνη, πεπτιδία (π.χ. μελιτίνη που συνιστά το 50% του ξηρού βάρους, αποτελούμενη από 26 αμινοξέα και είναι υπεύθυνη για την πρόκληση άλγους), καθώς και απαμίνη. Επίσης εντοπίζονται ένζυμα (π.χ. φωσφολιπάση A_2 που συνιστά το σημαντικότερο αλλεργιογόνο), μονοσακχαρίτες και λιπίδια. Η σύνθεση του δηλητηρίου ποικίλει στα διάφορα είδη, αν και παρατηρείται διασταυρούμενη αντίδραση μετά από νυγμό μέλισσας σε άτομα που είναι ευαισθητοποιημένα στο δηλητήριο της σφήκας, γεγονός που μπορεί να προκαλέσει ακόμα και το θάνατο. Τα συμπτώματα από τη νύξη αυτών των εντόμων άλλοτε είναι τοπικά, οπότε εμφανίζεται ερυθρότητα στο προσβληθέν σημείο του δέρματος, οίδημα και έντονος πόνος, άλλοτε (σπανιότερα γενικά) προκαλείται βαρεία αλλεργική προσβολή με γενική κακουχία, ναυτία, πτώση της αρτηριακής πίεσης και απώλεια των αισθήσεων (ιδίως στα παιδιά), έμετο, ελαφρύ πυρετό, οίδημα του προσώπου και του λάρυγγος, πιθανότατα με σπασμούς. Επί πολλαπλών νύξεων στην τραχηλική χώρα και στη γλώσσα έχουν παρατηρηθεί θάνατοι από ασφυξία (λόγω οιδήματος της γλωττίδας). Η νύξη περιφερικού αγγείου μπορεί να επιφέρει θάνατο από θρομβώσεις. Η αντιμετώπιση των πιθανών αλλεργικών αντιδράσεων επιτυγχάνεται με χορήγηση αδρεναλίνης, αντιισταμινικών και κορτικοστεροειδών. Η θεραπεία γενικότερα συνίσταται στην άμεση πλύση του τραύματος, στην αφαίρεση του κεντριού, στην τοπική εφαρμογή βάσεως (αμμωνίας) ή οξέος (ξίδι, λεμόνι) και αντιφλογιστικών ουσιών (επιθέματα πάγου). Τα γενικά φαινόμενα αντιμετωπίζονται συμπτωματικά³⁸.



Εικόνα 23. Φύλλο 3 Άνδρας που προσπαθεί να δραπετεύσει από επίθεση μελισσών, εικονογράφηση από τα Θηριακά του Νικάνδρου (Βυζαντινός κώδικας 10^{ου} αιώνα μ.Χ, Ms Supp Grec 247), Εθνική Βιβλιοθήκη Γαλλίας, Παρίσι

6.2 Παραδοσιακές θεραπείες δηγμάτων ανά τον κόσμο

Η θεραπεία των δηγμάτων που προκαλούνται από είδη οφιοειδών και άλλων ερπετών μπορεί εναλλακτικά να προέλθει από τη φύση τόσο υπό τη μορφή εκχυλισμάτων όσο και απομονωμένων δευτερογενών μεταβολιτών. Οι πληροφορίες για αυτού του είδους τον τρόπο αντιμετώπισης πηγάζουν από την παραδοσιακή θεραπευτική διαφόρων λαών. Στόχος της καθιέρωσης των παραδοσιακών σκευασμάτων που χρησιμοποιούνται ανά τον κόσμο για την αντιμετώπιση δηγμάτων, είναι η συνεργιστική και συμπληρωματική δράση τους ως προς τις σύγχρονες θεραπείες των αντιοφικών ορών έτσι ώστε να αποτραπεί η περαιτέρω διάχυση του δηλητηρίου στον οργανισμό, να αυξηθούν οι πιθανότητες επιβίωσης του θύματος και να μειωθούν οι τοπικές βλάβες που είναι πιθανόν να προκληθούν όπως η νέκρωση του προσβαλλόμενου ιστού⁴².

Οι παραδοσιακοί θεραπευτές χρησιμοποιούν μια πληθώρα βοτάνων για την αντιμετώπιση αυτού του τύπου δηλητηριάσεων. Τα τμήματα των φυτών που αξιοποιούνται είναι τα φύλλα, οι βλαστοί και οι ρίζες. Οι κύριες οδοί χορήγησης είναι η επιδερμική, με επάλειψη στην περιοχή του δήγματος, ή η λήψη διαλύματος *per os*. Στη βιβλιογραφία εντοπίζεται μεγάλος αριθμός μελετών σχετικά με την παραδοσιακή χρήση φυτών ανά τον κόσμο για την εξάλειψη των συμπτωμάτων της δηλητηρίασης από δήγματα ερπετών. Εθνοβοτανικοί και άλλοι μελετητές μέσα από συνεντεύξεις σε παραδοσιακούς θεραπευτές, ιατρούς και ιερείς των φυλών ή σαμάνους, γεωργούς ή ακόμη και απλούς ανθρώπους με γνώσεις παραδοσιακών θεραπευτικών πρακτικών, αλλά και με την άμεση παρατήρηση της χρήσης από τους αυτόχθονες καταφέρνουν

να συλλέγουν πληροφορίες σχετικά με αυτοφυή φυτά, ενδείξεις αυτών και τον τρόπο χορήγησης τους⁴³. Ωστόσο, η πραγματοποίηση μελετών με σύγχρονα επιστημονικά μέσα για την επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας των πληροφοριών αυτών θεωρείται επιβεβλημένη. Τα προβλήματα που αντιμετωπίζονται σε αυτού του είδους την έρευνα έχουν να κάνουν με τη δυσκολία αντιστοίχισης του βοτάνου που περιγράφουν οι ιθαγενείς με τη σύγχρονη λατινική ονομασία ενώ συχνά παραλείπεται η αναφορά στο μέρος του φυτού που χρησιμοποιείται και στον τρόπο χορήγησης. Οι φαρμακολογικοί έλεγχοι που στηρίζουν την παραδοσιακή χρήση θα πρέπει επιτυχώς να αναπαράγουν τις συνθήκες και τις επιδράσεις της δηλητηρίασης που προκαλούνται από δήγμα ερπετών ενώ συγχρόνως θα πρέπει να μην έχουν υψηλό κόστος, να επιτρέπουν τον έλεγχο μεγάλου αριθμού δειγμάτων και να είναι κοινωνικώς αποδεκτές. Έτσι λοιπόν, οι δοκιμασίες, οι οποίες πραγματοποιούνται για την επίτευξη αυτού του στόχου, μπορούν να διακριθούν σε τρεις κατηγορίες:

1. Πειράματα *in vitro* με τη χρήση ενζύμων: άμεση δοκιμασία αναστολής ενζύμου η οποία μπορεί να εφαρμοστεί για τον έλεγχο μεγάλου αριθμού δειγμάτων, τόσο εκχυλισμάτων όσο και απομονωμένων καθαρών ουσιών (π.χ. δοκιμασία αναστολής πρωτεάσης παρουσία κασεΐνης, κολλαγόνου, ελαστίνης). Μπορεί να πραγματοποιηθεί έλεγχος ικανότητας εξουδετέρωσης τοξινών στο απομονωμένο δηλητήριο φιδιού.
2. Πειράματα σε απομονωμένους ιστούς: Απαιτεί μικρότερες δόσεις καθώς και λιγότερο χρόνο για κάθε πείραμα. Επιπλέον το κάθε πείραμα μπορεί να διαμορφωθεί ανάλογα με το εξεταζόμενο δηλητήριο ή την εξεταζόμενη ιδιότητα (π.χ. δοκιμασία έναντι νευροτοξικού δηλητηρίου κόμπρας, δοκιμασίες νευρομομικής μεταβίβασης και δοκιμασίες πήξης του αίματος για εξέταση της επίδρασης του θεραπευτικού βοτάνου στην αιμορραγία που προκαλείται από το δηλητήριο).
3. Πειράματα *in vivo* σε ζώα: Ελέγχεται η προστασία ολόκληρου του ζώου (συνήθως χρησιμοποιούνται μύες) έναντι μιας καθορισμένης ποσότητας δηλητηρίου, κατόπιν χορήγησης εκχυλίσματος ή απομονωμένων καθαρών συστατικών του φυτού.

Μέσα από αυτές τις μελέτες έχουν γίνει γνωστά εκατοντάδες φυτά που αποτελούν μέρος της παραδοσιακής αντιμετώπισης δηγμάτων όφεων. Πολλές είναι οι λίστες θεραπευτικών βοτάνων που έχουν δημιουργηθεί από μελέτες και περιλαμβάνουν περισσότερα από 700 είδη που χρησιμοποιούνται από πληθυσμούς σε όλο τον κόσμο ενάντια των δηγμάτων. Οι οικογένειες που αναφέρονται περισσότερο στη βιβλιογραφία είναι οι Acanthaceae, Apocynaceae,

Aristolochiaceae, Compositae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Labiatae, Leguminosae, Menispermaceae, Moraceae, Piperaceae, Rubiaceae, Solanaceae^{43 29 44}. Στη συνέχεια αναφέρονται ενδεικτικά κάποιες μελέτες σχετικές με τη αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας φυσικών θεραπευτικών μέσων έναντι δηλητηριωδών δηγμάτων:

- Εκχυλίσματα του είδους *Morus alba* (Moraceae) είναι δραστικά ενάντια στο δηλητήριο του φιδιού *Daboia russellii*, μέσω αναστολής της κασεΐνολυτικής, υαλουρονολυτικής, οίδηματογόνου, αιμορραγικής και προ-πηκτικής δράσης⁴³. Το είδος *Mucuna pruriens* (Fabaceae) και συγκεκριμένα τα σπέρματα αυτού χρησιμοποιούνται από κοινωνίες της Νιγηρίας για την προστασία του καρδιακού μυός και των αιμοφόρων αγγείων καθώς και για την αποτροπή της θνησιμότητας από δηλητήρια των ειδών *Naja kaouthia*, *Naja nivea* και *Calloselasma rhodostoma*⁴⁵. Η δράση αυτή έχει αποδοθεί σε μια γλυκοπρωτεΐνη τύπου Kunitz που λειτουργεί ως αναστολέας της τρυψίνης⁴⁶.

- Φύλλα του είδους *Cordia verbenacea* (Boraginaceae), το οποίο φύεται στη Βραζιλία, αναστέλλουν σημαντικά το οίδημα που προκαλείται από δήγμα *Bothrops jararacussu* και συγκεκριμένα από τη φωσφολιπάση A₂ και τις λουιές τοξίνες (bothropstoxins) 1 και 3. Η δράση αποδίδεται στο ροσμαρινικό οξύ το οποίο εμφανίζει αντιφλεγμονώδεις και αντιμυοτοξικές ιδιότητες⁴⁷.



Εικόνα 24. Φυτικό είδος *Cordia verbenacea*

- Εκχύλισμα φύλλων του φυτού *Guiera senegalensis* (Combretaceae), το οποίο φύεται σε περιοχές της Νιγηρίας και του Καμερούν που χαρακτηρίζονται από υψηλή επικινδυνότητα, έχει χρησιμοποιηθεί από βοσκούς και χωρικούς έναντι δηγμάτων φιδιών, ενώ επέδειξε ικανότητα αδρανοποίησης *in vitro* του δηλητηρίου δύο κοινών φιδιών (*Echis carinatus* και *Naja nigricollis*) που απαντώνται στη Βόρεια Νιγηρία⁴⁸.

- Τα φύλλα του είδους *Sapium sebiferum* (Euphorbiaceae) χρησιμοποιούνται στην παραδοσιακή κινέζικη θεραπευτική για τη θεραπεία, μεταξύ άλλων, και του δήγματος φιδιού,

ενώ η δράση αυτή αποδόθηκε κυρίως στα φαινολικά συστατικά τα οποία φέρουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες⁴⁹.

- Η ρίζα του είδους *Mimosa pudica* (Mimosaceae), η οποία έχει χρησιμοποιηθεί στην παραδοσιακή ινδική θεραπευτική, βρέθηκε ότι αναστέλλει τα ένζυμα υαλουρονιδάση και πρωτεάση των δηλητηρίων των ινδικών φιδιών *Naja naja*, *Vipera russellii* και *Echis carinatus*. Επιπλέον τα φύλλα και οι βλαστοί έχουν χορηγηθεί παραδοσιακά σε τσιμπήματα σκορπιού⁵⁰.



Εικόνα 25. Φυτικό είδος *Mimosa pudica*

- Αρκετές αναφορές υπάρχουν για την παραδοσιακή θεραπευτική χρήση ειδών του γένους *Aristolochia* (Aristolochiaceae) ενάντια δηγμάτων οφιοειδών. Οι αναφορές αυτές αποκτούν και επιστημονική βάση καθώς εκχυλίσματα που προέρχονται από τη ρίζα ειδών *Aristolochia* εξουδετερώνουν το δηλητήριο του φιδιού *Naja naja* και μειώνουν την αιμορραγία που προκαλείται από δήγμα του *Trimeresurus mucronata*. Το αριστολοχικό οξύ, το οποίο έχει απομονωθεί από πολλά είδη του γένους *Aristolochia*, αναστέλλει τις φωσφολιπάσες των δηλητηρίων ειδών *Trimeresurus flavoviridis* και *Vipera russellii*^{51 52}.

- Στις βόρειες περιοχές της Κολομβίας χρησιμοποιείται παραδοσιακά για τη θεραπεία των δηγμάτων φιδιών το φυτό *Renealmia alpinia* (Zingiberaceae), το οποίο είναι πλούσιο σε φλαβονοειδή, ταννίνες, τερπενοειδή και κουμαρίνες. Έχει δειχθεί ότι μπορεί να εξουδετερώνει την αιμορραγική και ιστολυτική δράση του δηλητηρίου του φιδιού *Bothrops asper*, ενώ αναστέλλει τη Batx-I μεταλλοπρωτεϊνάση του δηλητηρίου του *Bothrops atrox* καθώς και τη σερίνο-πρωτεϊνάση Cdc SII του δηλητηρίου *Crotalus durissus cumanensis*⁴².

- Φυλές του Αμαζονίου χρησιμοποιούν το φλοιό του *Pentaclethra macroloba* (Mimosaceae) για την καταπολέμηση του δηλητηρίου όφεων. Έρευνες έχουν δείξει ότι αυτό φέρει αντιαιμορραγικές ιδιότητες καθώς και ανασταλτική δράση έναντι των DNA-ασων. Επιπλέον, έχουν αναφερθεί η ικανότητα μερικής αναστολής της μυτοζικής/ιστολυτικής δράσης

του δηλητηρίου και των φωσφολιπασών του καθώς και η αντιφλεγμονώδης δράση του φυτικού αυτού είδους⁵³.

- Η ρίζα του είδους *Hemidesmus indicus* (Asclepiadaceae), το οποίο απαντάται σε όλη την Ινδία και χρησιμοποιείται ευρέως στην Αγιουβέρδα και στην θεραπευτική Υναπi (παραδοσιακή θεραπευτική της Μέσης Ανατολής και Νότιας Ασίας), έχει αξιοποιηθεί ως αντίδοτο φιδιού. Το περιεχόμενο 2-υδροξυ-4-βενζοϊκό οξύ έχει βρεθεί ότι εξουδετερώνει το δηλητήριο του όφεως *Daboia russellii*. Επίσης ο οξικός εστέρας της λουπεόλης ελαττώνει σημαντικά την αιμορραγία, την ιστολυτική δράση του δηλητηρίου, την φλεγμονή και τη δράση της φωσφολιπάσης A₂, ενώ περιορίζει σημαντικά τη θνησιμότητα που προκαλείται από το δήγμα του όφεως. Ακόμη, εμφανίζει δράση έναντι της καρδιοτοξικότητας, νευροτοξικότητας και των επιπλοκών του αναπνευστικού που προκαλούνται από το δηλητήριο του *Naja kaouthia*⁵⁴.

- Έχει δειχθεί ότι το αιθανολικό εκχύλισμα του είδους *Hypericum brasiliense* (Guttiferae) μπορεί να ελαττώσει την πιθανότητα θανάτου σε περίπτωση δήγματος από το είδος *Bothrops jararaca*, μέσω αναστολής του οιδήματος και της πρωτεολυτικής δράσης του δηλητηρίου⁴².

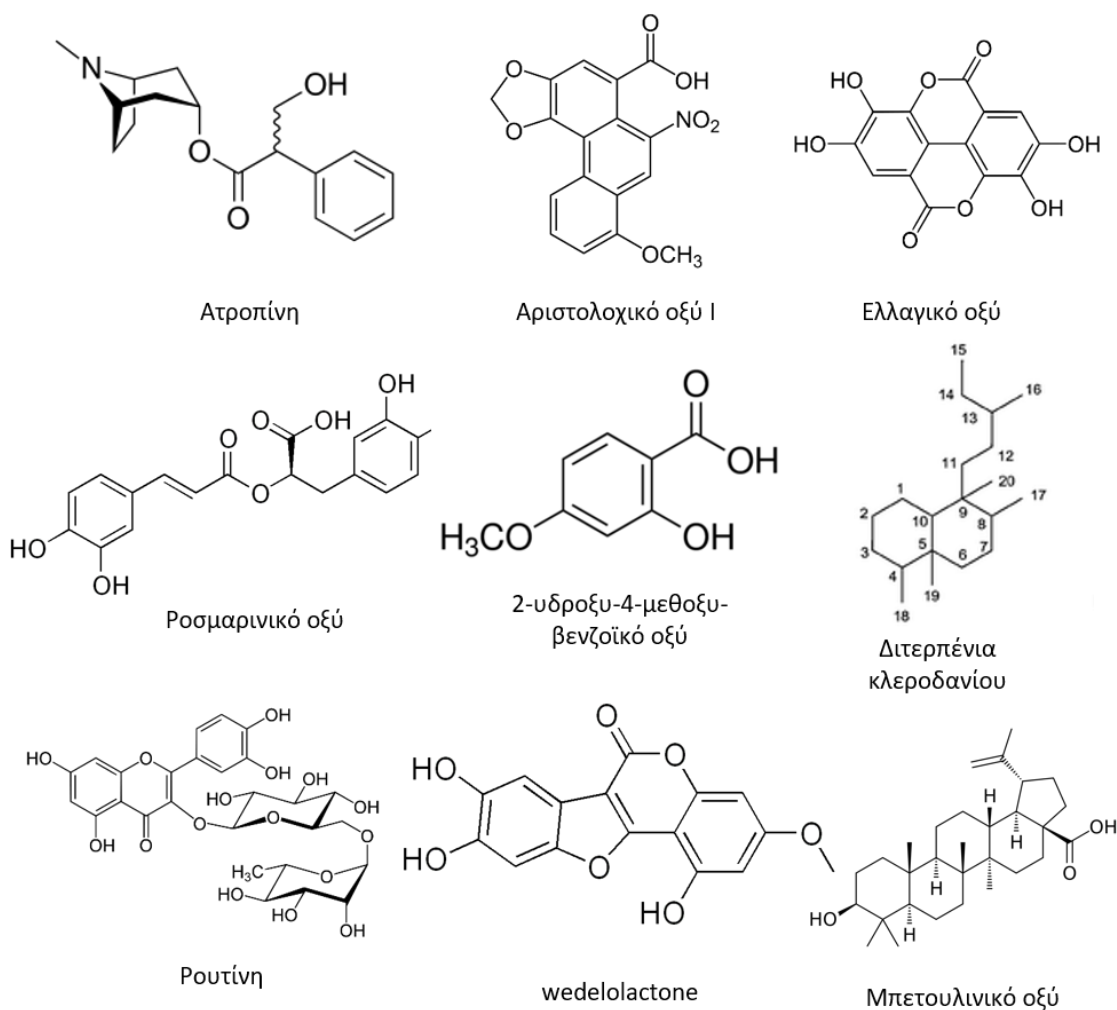


Εικόνα 26. Φυτικό είδος *Hypericum brasiliense*

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες που προέρχονται από τη φύση και μπορούν να λειτουργήσουν είτε ως μονοθεραπεία είτε ως συμπληρωματικοί παράγοντες προς τη βασική θεραπεία, του αντιοφικού ορού, είναι σχετικά ασφαλείς, χωρίς αναφερόμενες σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες (υπάρχουν εξαιρέσεις), και σταθερά μόρια, συνεπώς μπορούν να φυλάσσονται για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα και να εξουδετερώνουν ένζυμα-στόχους όπως είναι η φωσφολιπάση A₂, η υαλουρονιδάση, η πρωτεάση, η L-αμινοξυ οξειδάση, η 5' νουκλεοτιδάση κ.τ.λ. Οι ουσίες αυτές ανήκουν στις κατηγορίες των φαινολικών, των αλκαλοειδών, των οξέων, των κουμestanών, των πτεροκαρπανών, των στεροειδών, των ταννινών κ.ά. Από τα αλκαλοειδή η ατροπίνη (οικογένεια Solanaceae) αποτελεί έναν χολινεργικό αναστολέα, η ουσία AIPLAI, που προέρχεται από τα φύλλα του φυτού *Azadirachta indica* αποτελεί αναστολέα της φωσφολιπάσης A₂ και τα αριστολοχικά οξέα, που απομονώνονται από

τη ρίζα των ειδών *Aristolochia*, έχει βρεθεί ότι ελαττώνουν την ενζυμική και φαρμακολογική δράση της βασικής φωσφολιπάσης A_2 από δηλητήριο του είδους *Vipera russelii*. Ως μειονεκτήματα των ουσιών που ανήκουν στην κατηγορία του αριστολοχικού οξέος αναφέρονται η τοξικότητα και το ότι δεν παρουσιάζουν συνεισφορά στην επαναφορά του θύματος, παρά μόνο στην ελάττωση του προκαλούμενου οιδήματος. Άλλα οξέα όπως το 2-υδροξυ-4-μεθοξυ βενζοϊκό οξύ που παραλαμβάνεται από το είδος *Hemidesmus indicus* φέρει αντιφλεγμονώδεις, αντιπυρετικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες καθώς επίσης ενισχύει τη δράση του αντιοφικού ορού ενάντια των ειδών *Daboia russelii* και της οχιάς. Η παρουσία των μεθοξυ και υδροξυ υποκαταστατών του μορίου συμβάλλει στην εξουδετέρωση των αιμορραγικών επιπτώσεων της δηλητηρίασης. Το ροσμαρινικό οξύ, ουσία που απομονώνεται από πολλά είδη, φέρει αντιφλεγμονώδεις και προστατευτικές ενάντια της μυοτοξικότητας δράσεις ενώ δεν παρουσιάζει καμία δράση προς την φωσφολιπάση. Για τα στεροειδή έχει δειχθεί ότι μπορούν να δημιουργούν σύμπλοκα που συγκρατούνται μέσω δυνάμεων Van der Waals και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Παράγωγα όπως η β-σιτοστερόλη δρουν ως αναστολείς της φωσφολιπάσης A_2 και της L-αμινοξυ οξειδάσης προερχόμενων από δηλητήριο κόμπρας. Τα φλαβονοειδή μπορούν να δρουν ενάντια της φωσφολιπάσης A_2 , λιποξυγενάσης κ.ά. έχοντας έτσι αντιφλεγμονώδεις, αντι-ηπατοτοξικές, αντι-υπερτασικές, αντι-αρρυθμικές και αντι-αλλεργικές ιδιότητες. Η ρουτίνη αναστέλλει μερικώς την ομάδα I φωσφολιπάσης A_2 από την κόμπρα *Naja Naja* και ισχυρώς την ομάδα II φωσφολιπάσης A_2 από την οχιά *Vipera russelii* και τον κροταλία *Crotalus atrox*. Άλλα φλαβονοειδή είναι η πριμετίνη (5,8-διυδροξυ φλαβόνη), η κερκετίνη, η εσπεριδίνη, η καιμπφερόλη, η απιγενίνη κ.ά. Από τις κουμεστάνες η ουσία wedelolactone, η οποία απομονώνεται από το είδος *Eclipta prostrate* (Asteraceae), αναστέλλει εκλεκτικώς την 5-λιποξυγενάση ενώ παρουσιάζει αντι-μυοτοξικές, αντι-αιμορραγικές, αντι-πρωτεολυτικές, και αντι-φωσφολιπασικές ιδιότητες. Από τις πτεροκαρπάνες οι ουσίες cabenegrins A-I και A-II, χρησιμοποιούνται από την παραδοσιακή θεραπευτική της βορειοανατολικής Βραζιλίας ως συστατικά αντιοφικού φαρμάκου (*Específico Pessoa*) ενώ από τα τερπενοειδή, τα διτερπένια του κλεροδανίου όπως το 7 α -υδροξυ-3,13-κλεροδαδιενο-16, που απομονώνεται από το είδος *Baccharis trimera* (Asteraceae), φέρει αντι-πρωτεολυτικές και αντι-αιμορραγικές ιδιότητες ενάντια δηλητηρίου οφιοειδών, ιδιαίτερα του γένους *Bothrops* και από τα τριτερπένια, τα πεντακυκλικά τριτερπένια όπως το μετουλινικό οξύ επιδεικνύουν δράση ενάντια του ενζύμου της φωσφολιπάσης A_2 . Η τριτερπενική σαπωνίνη γλυκυρριζίνη, που απομονώνεται από το είδος *Glycyrrhiza glabra*, επιδεικνύει αντιφλεγμονώδη δράση. Ακόμη οι ταννίνες παρουσιάζουν

θεραπευτικές ιδιότητες, π.χ. το ελλαγικό οξύ είναι δραστικό ενάντια του δηλητηρίου που προέρχεται από το γένος *Bothrops*. Τέλος, η κουρκουμίνη, μια πολυφαινόλη που απομονώνεται από ριζώματα του είδους *Curcuma longa* (Zingiberaceae) και από άλλα είδη του γένους *Curcuma*, αναφέρεται ως παραδοσιακή θεραπεία δηλητηρίασης από δήγμα οφιοειδών ενώ έχει δειχθεί ότι μπορεί να αναστείλει τη νευροτοξικότητα που προκαλείται από το φίδι *Naja naja siamensis* όπως επίσης να λειτουργήσει ως αναστολέας της υαλουρονιδάσης του δηλητηρίου του είδους *Naja kaouthia*^{42 55}.



Εικόνα 27. Δευτερογενείς μεταβολίτες που είναι δραστικοί ενάντια στη δηλητηρίαση από οφιοειδή

Στοιχεία παραδοσιακής θεραπείας των νυγμών σκορπιού με βότανα υπάρχουν από όλες σχεδόν τις περιοχές του πλανήτη με εκπροσώπους από 50 οικογένειες, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται οι Apocynaceae, Aristolochiaceae, Compositae, Euphorbiaceae, Leguminosae⁵⁶.

- Η ταϊλανδέζικη θεραπευτική περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό βοτάνων ως αντίδοτα σε νυγμό σκορπιού, όπως είναι τα *Andrographis paniculata* (Acanthaceae), *Barringtonia acutangula* (Lecythidaceae), *Calamus* sp. (Palmae), *Clinacanthus nutans* L. (Acanthaceae), *Euphorbia neriiifolia* L. (Euphorbiaceae), *Ipomoea aquatica* (Convolvulaceae), *Mesua ferrea* L. (Guttiferae), *Passiflora laurifolia* L. (Passifloraceae), *Plectranthus amboinicus* (Labiatae), *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae), *Rumex* sp. (Polygonaceae) και *Sapindus rarak* (Sapindaceae). Ωστόσο μόνο για τα δύο πρώτα έχει επιβεβαιωθεί η αποτελεσματικότητά τους έναντι της λύσης των ινοβλαστών που ακολουθεί την έγχυση του δηλητηρίου⁵⁷.

- Στην περιοχή της Μπουρκίνα Φάσο οι τοπικοί θεραπευτές χρησιμοποιούν τους καρπούς του φυτού *Cola nitida* (Sterculiaceae) και τα φύλλα και τους βλαστούς του *Khaya senegalensis* (Meliaceae) ως αντίδοτα στο τσίμπημα σκορπιού⁵⁸.

- Στη νότια Ινδία το φυτικό είδος *Acalypha indica* (Euphorbiaceae) ενδείκνυται για δηλητηριάσεις από σκορπιούς και αραχνοειδή. Τα φύλλα του *Gymnema sylvestre* (Aprocynaceae) είναι επίσης κοινώς χρησιμοποιούμενα στις φυλές Κάνι, που ζουν στα όρη Tirunelveli στα νοτιοανατολικά της ινδικής χερσονήσου⁵⁹ ⁶⁰. Η φυλή Κορκού, στην περιοχή Amravati της κεντρικής Ινδίας χρησιμοποιεί τη ρίζα του *Abelmoschus ficulneus* (Malvaceae), καθώς και τα φύλλα των *Annona squamosa* L. (Annonaceae), *Bauhinia racemosa* Lam. (Caesalpiniaceae) και *Ficus racemosa* L. (Moraceae)⁶¹.

- Στην ασιατική παράδοση αναφέρονται αρκετά είδη ορχιδέας (Orchidaceae) ως αντίδοτα σε δήγματα φιδιών και σκορπιών, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται η ρίζα και τα φύλλα του είδους *Acampe carinata*, φύλλα, καρποί ή και ολόκληρο το φυτό *Desmotrichum fimbriatum*, φύλλα και ρίζες των ειδών *Vanda parviflora*, *Vanda tessellata*, *Vanda testacea*⁶².

- Το υδατικό εκχύλισμα του βραζιλιάνικου θεραπευτικού φυτικού είδους *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) έχει δειχθεί ότι περιορίζει τη φλεγμονή που οφείλεται στο δηλητήριο του σκορπιού *Tityus serrulatus*⁶³.

Όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως στην περίπτωση νυγμού από μέλισσα λίγα είναι τα περιστατικά που κρίνονται σοβαρά και απειλητικά για τη ζωή του θύματος καθώς στις περισσότερες περιπτώσεις η μικρή δόση του δηλητηρίου που εγχύεται δεν απαιτεί ιδιαίτερη ιατρική προσοχή με εξαίρεση τις αντιδράσεις υπερευαισθησίας ή αριθμού νυγμών μεγαλύτερου των 30. Συνεπώς οι ασθενείς δεν χρειάζεται να λάβουν κάποια συγκεκριμένη θεραπεία καθώς το

ίδιο το ανοσοποιητικό εξουδετερώνει το δηλητήριο και η αγωγή που χορηγείται είναι συμπτωματική. Οι παραδοσιακές θεραπείες που έχουν αναφερθεί αφορούν την αντιμετώπιση μέτριας σοβαρότητας συμπτωμάτων ενώ αποτελούν θεραπευτική επιλογή πρώτης γραμμής για κάποιες ομάδες πληθυσμών. Συνηθίζεται η παρασκευή υδατικών ή αλκοολικών εκχυλισμάτων τα οποία εφαρμόζονται είτε ως καταπλάσματα, τοπικά είτε δια του στόματος για μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα της θεραπείας σε περίπτωση που η δρόγη κρίνεται ασφαλής και δεν φέρει τοξικότητα. Θεραπευτικά βότανα που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι τα *Andrographis paniculata* (Acanthaceae), *Barleria lupulina* (Acanthaceae), *Ipomoea aquatica* (Convolvulaceae), *Impatiens balsamina* (Balsaminaceae) και *Jussiaea repens* (Onagraceae). Σε παλιές φαρμακευτικές συνταγές της Ταϊλάνδης, περίπου 100 φυτικά είδη έχουν αναφερθεί για την αντιμετώπιση νυγμών προερχόμενων από έντομα. Από αυτά μόνο τέσσερα φαίνεται να είναι εκλεκτικά για το δηλητήριο της μέλισσας⁶⁴.

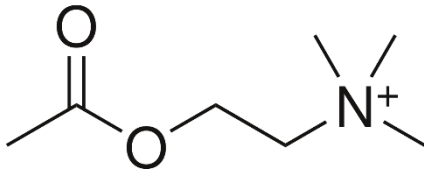


Εικόνα 28. Φυτικά είδη *Jussiaea repens* και *Ipomoea aquatic*

6.3 Ακετυλοχολινεστεράση

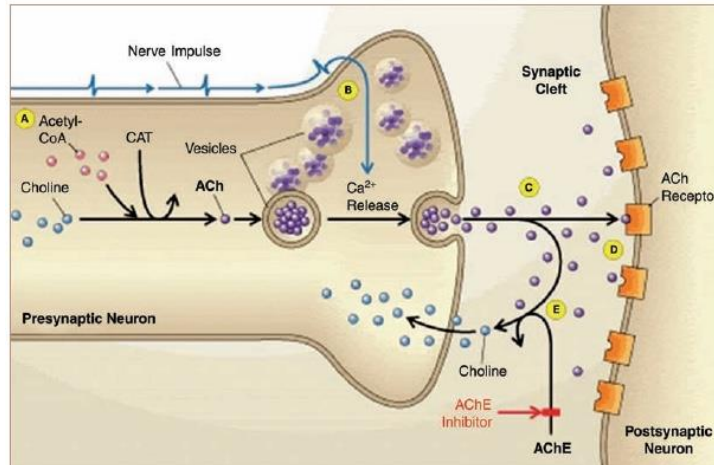
6.3.1 Γενικά

Η μεταφορά της πληροφορίας από τον έναν νευρώνα στον άλλο μπορεί να πραγματοποιείται είτε ηλεκτρικά είτε χημικά (ηλεκτρικές και χημικές συνάψεις). Στην περίπτωση των χημικών συνάψεων η μετάδοση της πληροφορίας επιτελείται μέσω χημικού σήματος, του νευροδιαβιβαστή. Ως νευροδιαβιβαστές ορίζονται τα μόρια τα οποία συντίθενται στον προσυναπτικό νευρώνα, πακετάρονται σε κυστίδια και μεταφέρονται στο τελικό κομβίο του νευράξονα, περιμένοντας το δυναμικό δράσης για να απελευθερωθούν στη συναπτική σχισμή. Χωρίζονται σε τρεις βασικές κατηγορίες ανάλογα με τη χημική τους δομή και αυτές είναι: 1. μικρο-μόρια όπως ακετυλοχολίνη, αμίνες, αμινοξέα, 2. πεπτίδια όπως οι οπιοειδείς νευροδιαβιβαστές και 3. αέρια νευροδιαβιβαστικά μόρια όπως το μονοξειδίο αζώτου και μονοξειδίο άνθρακα. Είναι υδρόφιλα μόρια μη ικανά να διαπεράσουν τη λιπιδική διπλοστιβάδα και έτσι το σήμα τους



Εικόνα 29. Ακετυλοχολίνη

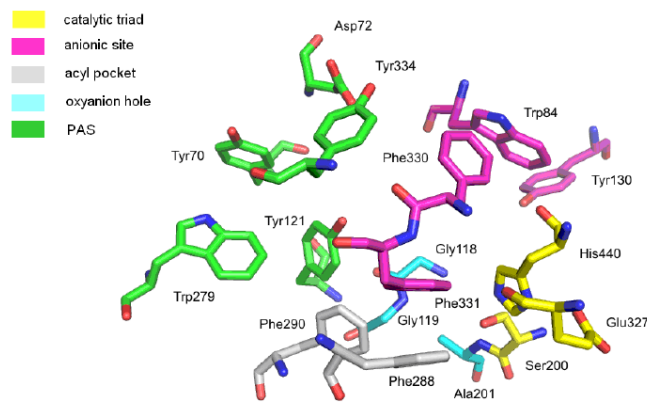
διεκπεραιώνεται κατά την πρόσδεσή τους σε ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων στόχων. Στο συμπαθητικό και παρασυμπαθητικό σύστημα του Αυτόνομου Νευρικού Συστήματος (ΑΝΣ) η συναπτική διαβίβαση μεταξύ του προγαγγλιακού και μεταγαγγλιακού νευρώνα (που ορίζεται ως 'γαγγλιακή διαβίβαση' εφόσον η σύναψη εντοπίζεται σε ένα γάγγλιο) ρυθμίζεται από την ακετυλοχολίνη (Acetylcholine, ACh)⁶⁵. Η ACh (Εικόνα 29) αποτελεί το νευροδιαβιβαστή σε έξι συνάψεις: στις μεταγαγγλιακές του παρασυμπαθητικού, στα συμπαθητικά και παρασυμπαθητικά γάγγλια, στη νευρομυϊκή σύναψη, στις συνάψεις του ΚΝΣ, στο μυελό των επινεφριδίων και στους ιδρωτοποιούς αδένες. Οι ιοντοτρόποι υποδοχείς της ACh είναι οι νικοτινικοί ενώ οι μεταβολικοτρόποι είναι οι μουσκαρινικοί 1-5. Η ACh αποτελεί τον πρώτο χημικό παράγοντα που αποδείχθηκε ότι παίζει ρόλο στην επικοινωνιακή σύνδεση ανάμεσα σε δύο ξεχωριστά κύτταρα θηλαστικού, και συγκεκριμένα δρα μέσω της αναπαραγωγής ενός ηλεκτρικού ερεθίσματος κατά μήκος της σύναψης. Αποτελεί τον πρώτο νευροδιαβιβαστή που ανακαλύφθηκε ενώ οι ερευνητές Dale και Lowei κέρδισαν το βραβείο Nobel το 1936 για αυτή τους την ανακάλυψη. Η μεταφορά ενός χημικού σήματος (παλμού) λαμβάνει χώρα εντός χρόνου 1ms και απαιτεί επακριβή ολοκλήρωση των δομικών και λειτουργικών στοιχείων της σύναψης. Οι χολινεργικοί νευρώνες εντοπίζονται τόσο στο περιφερικό όσο και στο κεντρικό νευρικό σύστημα με συνέπεια στις φυσιολογικές δράσεις της ακετυλοχολίνης να περιλαμβάνονται η μείωση της καρδιακής συχνότητας και παροχής, η μείωση της αρτηριακής πίεσης, η αύξηση κινητικότητας του ΓΕΣ, η αύξηση βρογχικών εκκρίσεων. Επίσης η ACh εμπλέκεται στις λειτουργίες μνήμης, προσοχής, επαγωγής ύπνου REM, ρύθμισης της συμπεριφοράς, κίνησης κ.ά.



Εικόνα 30. Δράση αναστολέα AChE στη σύναψη

Οι χολινεστεράσες είναι μια οικογένεια ενζύμων που αναλαμβάνουν την κατάλυση της υδρόλυσης του νευροδιαβιβαστή ACh σε χολίνη και οξικό οξύ, μια αντίδραση που είναι απαραίτητη ώστε να επιτραπεί η επαναφορά ενός χολινεργικού νευρώνα σε κατάσταση ηρεμίας μετά την ενεργοποίησή του. Είναι τα υπεύθυνα ένζυμα για τον τερματισμό της χολινεργικής διαβίβασης και για τον έλεγχο της συγκέντρωσης της ACh στο συναπτικό χάσμα. Οι χολινεστεράσες χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Πρώτη κατηγορία αποτελεί η ακετυλοχολινεστεράση (ή ακετυλοχολίνη ακετυλοϋδρολάση) (AChE) (EC 3.1.1.7) η οποία απαντάται σε πολλούς τύπους απαγωγού ιστού όπως νεύρα και μύες, κεντρικούς και περιφερικούς ιστούς, κινητικές και αισθητικές ίνες, χολινεργικές και μη χολινεργικές ίνες. Η AChE κυρίως συντίθεται στα νευρικά, μυϊκά και σε συγκεκριμένα αιμοποιητικά κύτταρα. Η δραστηριότητα του ενζύμου είναι μεγαλύτερη στους κινητικούς νευρώνες απ' ότι στους αισθητικούς. Η AChE απαντάται επίσης στη μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων όπου συνιστά το Υτ αντιγόνο ομάδας αίματος. Το ένζυμο υφίσταται σε πολλαπλές μοριακές μορφές, οι οποίες επιτελούν παρεμφερείς καταλυτικές δράσεις αλλά διαφέρουν στην ολιγομερή μονάδα τους και στον τρόπο επισύναψής τους στην επιφάνεια του κυττάρου. Στον εγκέφαλο των θηλαστικών η πλειοψηφία των AChEs υπάρχει με τη μορφή τετραμερούς G4, ενώ πολύ μικρότερες ποσότητες βρίσκονται σε μια μονομερή G1 (4S) μορφή. Δεύτερη κατηγορία χολινεστεράσης αποτελεί η ψευδοχολινεστεράση (BuChE, EC 3.1.1.8), γνωστή και ως χολινεστεράση του πλάσματος, βουτυρυλοχολινεστεράση ή ακυλοχολίνη ακυλοϋδρολάση. Συντίθεται αρχικά στο ήπαρ και ακολούθως μεταφέρεται στο πλάσμα. Σε αντίθεση με την AChE, η BuChE υδρολύει την βουτυρυλοχολίνη πιο γρήγορα από την ACh. Θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό διατροφικών εστέρων, ίσως μόνο σε ορισμένα είδη. Ο φυσιολογικός ρολός της

BuChE είναι άγνωστος, αν και έχει δειχθεί ότι τα επίπεδα του ενζύμου παρουσιάζουν μια αύξηση κατά την εξέλιξη νευροεκφυλιστικών νόσων όπως στη νόσο Alzheimer (AD) σε αντίθεση με τα επίπεδα της AChE τα οποία παρουσιάζουν μείωση. Ο προστατευτικός ρόλος της BuChE επί του νευρικού συστήματος έχει εκδηλωθεί σε διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία δεν έφεραν AChE. Επιπροσθέτως, η AChE είναι μια υδρολάση της σερίνης που απαντάται κυρίως στη νευρομυϊκή σύναψη και στις χολινεργικές συνάψεις του εγκεφάλου. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω πρωταρχικός της ρόλος είναι ο τερματισμός της χολινεργικής διαβίβασης μέσω της υδρόλυσης της ACh. Η AChE έχει μια αξιοσημείωτα υψηλή εκλεκτικότητα καταλυτικής δράσης καθώς κάθε μόριο AChE αποδομεί περίπου 25.000 μόρια ACh το δευτερόλεπτο, πλησιάζοντας το ρυθμό διάχυσης μιας ελεγχόμενης αντίδρασης. Η AChE πιθανόν συνιστά ένα από τα ταχύτερα γνωστά ένζυμα⁶⁶.

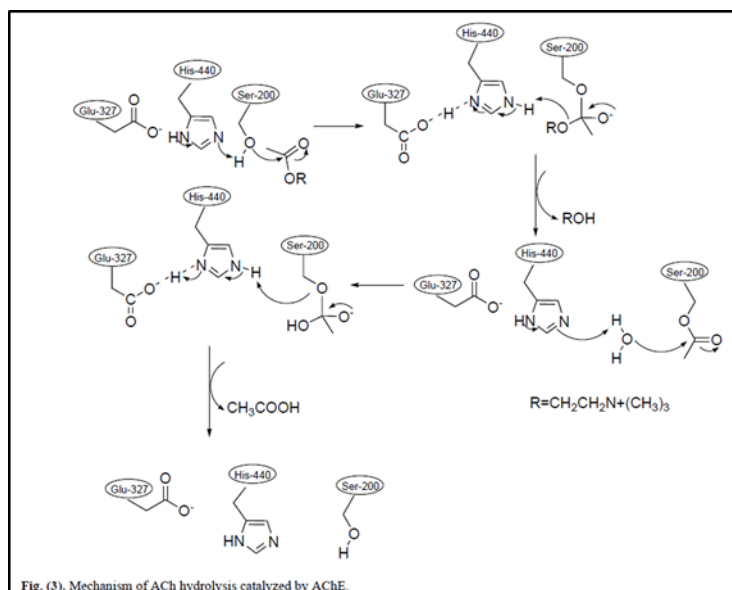


Εικόνα 31. Η δομή της ακετυλοχολινεστεράσης

Η πρώτη προσπάθεια απόδοσης δομής της AChE ήταν αυτή του ενζύμου που προέρχεται από το ηλεκτροφόρο σαλάχι *Torpedo californica*, το οποίο φέρει μεγάλες ποσότητες AChE στα ηλεκτροφόρα όργανά του (Εικόνα 31). Εκεί αποκαλύφθηκε ότι το ενεργό κέντρο του ενζύμου δε βρίσκεται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης αλλά στον πυθμένα μιας 20 Å μήκους σχισμής ευθυγραμμισμένης με αρωματικά τμήματα, κάτι που αποτελεί χαρακτηριστικό του ενζύμου. Το μόριο της AChE έχει ελλειψοειδές σχήμα με διαστάσεις ~ 45 Å, 60 Å, 65 Å. Το μονομερές του ενζύμου είναι μια α/β πρωτεΐνη που περιέχει 12 – ακινητοποιημένο κέντρο μαζί με β έλασμα που περιβάλλεται από 14 α έλικες. Τα διμερή της AChE σταθεροποιούνται μέσω μιας δέσμης τεσσάρων ελίκων. Προτού αποδοθεί πλήρως η δομή της AChE ήταν γνωστό ότι υπήρχαν δύο σημεία σύνδεσης για το θετικά φορτισμένο (κατιονικό) υπόστρωμα, τα οποία ονομάστηκαν ανιονικά τμήματα. Με την εύρεση της ακριβούς δομής του ενζύμου αποδείχθηκε ότι αυτά τα σημεία βρίσκονται και τα δύο μέσα στην προαναφερθείσα σχισμή αλλά κανένα από αυτά δεν

είναι ανιονικό στην πραγματικότητα. Σχηματίζονται από μια ομάδα αρωματικών τμημάτων, κυρίως τρυπτοφάνες. Ανάμεσα στα αρωματικά αμινοξέα, η τρυπτοφάνη 84 είναι σημαντική και η αντικατάστασή της με αλανίνη, προκαλεί μια μείωση κατά 3.000 φορές της ενζυμικής δραστηριότητας. Το ενεργό κέντρο της AChE λοιπόν, το οποίο βρίσκεται σε απόσταση 4 Å από τον πυθμένα του μορίου και είναι κεντροσυμμετρικό ως προς τη συνολική ενζυμική μονάδα, αποτελείται από 2 δευτερεύοντα σημεία, το περιφερειακό ανιονικό κέντρο (PAS) και το εστερατικό κέντρο (CAS) τα οποία συμβάλλουν στην αλλοστερική ρύθμιση της κατάλυσης και στην πρόσδεση της χολίνης, αντίστοιχα. Το περιφερειακό ανιονικό κέντρο (PAS) (Tyr 70, Asp 72, Tyr 121, Trp 279 and Tyr 334; *Torpedo* αρίθμηση) εντοπίζεται στην είσοδο της σχισμής και εκεί ακριβώς γίνεται η πρόσδεση της ACh⁶⁷. Η ACh δημιουργεί μια n-κατιονική αλληλεπίδραση με την τρυπτοφάνη, και το καρβονύλιο της ομάδας ακετυλίου αναπτύσσει έναν ασθενή δεσμό υδρογόνου με μια τυροσίνη που βρίσκεται πιο κάτω στη σχισμή. Η ACh και τα δομικά ανάλογά της όπως π.χ. η ακετυλοθειοχολίνη, είναι τα μόνα που παρατηρούνται σε αυτό το σημείο όταν υψηλές συγκεντρώσεις είναι παρούσες σε διάλυμα κρυστάλλωσης, κάτι το οποίο σημαίνει ότι το PAS δεσμεύεται μόνο παροδικά. Στη βάση της σχισμής ένα δεύτερο μόριο τρυπτοφάνης παίζει σημαντικό ρόλο στο εστερατικό κέντρο (CAS). Ξανά η ACh δημιουργεί μια n-κατιονική αλληλεπίδραση ανάμεσα στην τεταρτοταγή αμίνη και στο δακτύλιο της τρυπτοφάνης. Η ομάδα ακετυλίου δεσμεύεται από την ακυλο κοιλότητα (rocket), που έχει δημιουργηθεί από άλλα αρωματικά υπολείμματα που σχηματίζουν τη βάση της σχισμής. Στο ίδιο σημείο συνδέονται και τα τεταρτοταγή προσδέματα τύπου edrophonium, N-methylacridinium, που δρουν ως ανταγωνιστικοί αναστολείς και οι τεταρτοταγείς οξίμες οι οποίες επανενεργοποιούν αποτελεσματικά την AChE που έχει ανασταλεί από οργανοφωσφορικούς εστέρες. Ανάμεσα στα δύο κέντρα η σχισμή στενεύει λόγω μιας συμπίεσης που δημιουργείται από δύο αρωματικές πλευρικές αλυσίδες. Η συμπίεση αυτή είναι μικρότερη από το μέγεθος της ACh, κάτι το οποίο σημαίνει ότι η πρωτεΐνη πρέπει να υποστεί αξιοσημείωτες αλλαγές στη διαμόρφωση προκειμένου να διευρυνθεί και να επιτραπεί η είσοδος του υποστρώματος. Συνδεόμενη με το σημείο CAS και την ακυλο κοιλότητα (rocket), η ACh τοποθετείται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Τρία αμινοξέα, το γλουταμικό 327, η ιστιδίνη 440 και η σερίνη 200, γνωστά ως καταλυτική τριάδα, εντοπίζονται στο σημείο CAS και είναι κοινά και σε άλλες υδρολάσες της σερίνης. Αυτά τα αμινοξέα έχουν καθορισμένη λειτουργικότητα καθώς η ιστιδίνη και το γλουταμικό δίνουν ηλεκτρόνια στη σερίνη, κάνοντάς την δραστική. Η σερίνη είναι ικανή να σχηματίζει ομοιοπολικό δεσμό με την ACh, μειώνοντας συγχρόνως το διπλό δεσμό άνθρακα

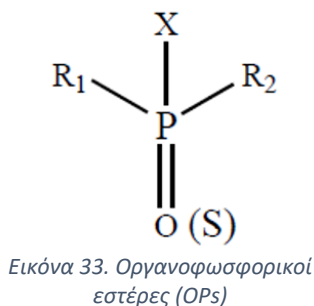
οξυγόνου. Αυτός ο τύπος σύνδεσης ονομάζεται τετραεδρικό ενδιάμεσο, μέσα στο οποίο το οξυγόνο είναι φορτισμένο. Αυτό το 'οξυανιόν' σταθεροποιείται μέσω αλληλεπιδράσεων με τον βασικό σκελετό ομάδων αμιδίου σε ένα σημείο γνωστό ως η 'τρύπα του οξυανιόντος'. Από αυτό το ενδιάμεσο ο δεσμός της ACh διασπάται, απελευθερώνοντας χολίνη και ακετυλο-σερίνη (Εικόνα 32). Ο δεσμός σερίνης-ακετυλίου υδρολύεται εν συνεχεία μέσω πυρηνόφιλης προσβολής από ένα μόριο νερού προκειμένου να απελευθερωθεί οξικό οξύ και να αναγεννηθεί το ελεύθερο ένζυμο. Λόγω του ότι το ενεργό κέντρο βρίσκεται πολύ βαθιά μέσα στην πρωτεΐνη, το υπόστρωμα περιβάλλεται σχεδόν εξ'ολοκλήρου από την πρωτεΐνη, σταθεροποιώντας το σχηματιζόμενο ενδιάμεσο και επιτρέποντας τον ταχύ ρυθμό κατάλυσης. Πέραν των δύο σημείων του ενεργού κέντρου που περιγράφηκαν, η AChE φέρει ένα ή περισσότερα 'πειφερειακά' ανιονικά μέρη ξεχωριστά από το σημείο πρόσδεσης της χολίνης στο ενεργό κέντρο. Αυτό εξυπηρετεί στην πρόσδεση της ACh αλλά και άλλων τεταρτοταγών προσδεμάτων που δρουν ως συναγωνιστικοί αναστολείς και συνδέονται σε σημείο ξεκάθαρα διακριτό από το κατειλημμένο από μονοτεταρτοταγείς ανταγωνιστικούς αναστολείς. Αυτό το σημείο συμπεριλαμβάνεται στα χαρακτηριστικά αναστολής του υποστρώματος της AChE. Η γνώση της δομής της AChE είναι απαραίτητη για την κατανόηση της υψηλής καταλυτικής της αποτελεσματικότητας και τη μοριακή βάση της αναγνώρισης της ACh από άλλες ACh-εκλεκτικές πρωτεΐνες (ACh υποδοχείς), καθώς επίσης και για την αποσαφήνιση του μηχανισμού δράσης που στηρίζει τις φαρμακολογικές και τοξικές ιδιότητες παραγόντων για τους σκοπούς του σχεδιασμού νέων φαρμάκων σε ορθολογική βάση.



Εικόνα 32. Μηχανισμός υδρόλυσης της ακετυλοχολίνης

6.3.2 Αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης (AChEIs)

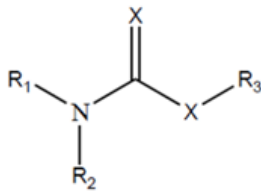
Οι αναστολείς της AChE (AChEIs, AChE inhibitors) μπορούν να εμφανίζουν είτε θεραπευτικές είτε τοξικές επιδράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό. Οι αναστολείς της AChE ή αλλιώς αντιχολινεστερασικοί παράγοντες παρεμποδίζουν το ένζυμο της χολινεστεράσης στο να διασπάσει την ACh, αυξάνοντας τόσο τα επίπεδα όσο και τη διάρκεια δράσης του νευροδιαβιβαστή. Υπάρχουν ποικίλες χημικές κατηγορίες AChEIs, στις οποίες περιλαμβάνονται αμινοακρίδινες, πιπεριδίνες, καρβαμάτες, οργανοφωσφορικοί εστέρες και τεταρτοταγή αλκαλοειδή. Με βάση τον τρόπο δράσης, οι AChEIs μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κατηγορίες: αντιστρεπτοί και μη αντιστρεπτοί. Οι αντιστρεπτοί αναστολείς, ανταγωνιστικοί ή μη ανταγωνιστικοί, έχουν στην πλειοψηφία τους θεραπευτικές δράσεις, ενώ τοξική επίδραση ασκούν κυρίως οι μη αντιστρεπτοί AChEIs.



Στους μη αντιστρεπτούς AChEIs ανήκουν οι οργανοφωσφορικοί εστέρες (OPs) οι οποίοι είναι εστέρες ή θειόλες που προέρχονται από φωσφορικό, φωσφονικό, φωσφινικό ή φωσφοραμιδικό οξύ. Οι R_1 και R_2 υποκαταστάτες μπορούν να είναι είτε αρυλο- είτε αλκυλο- ομάδες οι οποίες συνδέονται με το άτομο του φωσφόρου είτε απευθείας (phosphinates) είτε διαμέσου ενός ατόμου οξυγόνου ή θείου

(phosphate ή phosphothioates). Σε κάποιες περιπτώσεις η ομάδα R_1 συνδέεται απευθείας με το φωσφόρο, ενώ η ομάδα R_2 μέσω οξυγόνου ή θείου (phosphonates, thiophosphonates) (Εικόνα 33). Στις φωσφοραμιδάτες (phosphoramidates), μία τουλάχιστον ομάδα είναι $-NH_2$ (μη, μονο- ή δις-υποκατεστημένη) και το άτομο που σχηματίζει διπλό δεσμό με το φωσφόρο είναι είτε οξυγόνο είτε θείο. Η $-X$ ομάδα, η οποία επίσης συνδέεται με το φωσφόρο μέσω οξυγόνου ή θείου, μπορεί να ανήκει σε μια ευρεία κατηγορία υποκαταστατών όπως αλογόνα, αλειφατικοί, αρωματικοί ή ετεροκυκλικοί παράγοντες. Αυτή η αποχωρούσα ομάδα απελευθερώνεται από το άτομο του φωσφόρου κατά την υδρόλυση του OP από φωσφοδιεστεράσες ή κατόπιν αντίδρασης με πρωτεϊνικούς στόχους. Στην ιατρική και στη γεωργία, ο όρος οργανοφωσφορικά αναφέρεται στα εντομοκτόνα και στους νευρικούς παράγοντες που αναστέλλουν την AChE. Ωστόσο οι OPs δεν είναι εκλεκτικοί AChEIs μόνο για τα έντομα αλλά παρουσιάζουν την ίδια δράση και στον άνθρωπο. Συγκεκριμένα οι OPs αναστέλλουν μη αντιστρεπτά την ανθρώπινη AChE στο σημείο της σερίνης 203 (Ser203) προκαλώντας χολινεργική κρίση με εκδηλώσεις από τους μουσκαρινικούς (σιελόρροια, μύση), νικοτινικούς (νευρομυϊκός αποκλεισμός) υποδοχείς και στο ΚΝΣ. (αναπνευστική παράλυση) ή ακόμη και θάνατο σε περίπτωση μη θεραπευτικής αντιμετώπισης της δηλητηρίασης. Οι OPs εκδηλώνουν τα κύρια τοξικά τους αποτελέσματα μέσω μη αντιστρεπτής φωσφορυλίωσης των εστερασών του ΚΝΣ. Τα οξεία τοξικά συμπτώματα συνδέονται με την μη αντιστρεπτή αναστολή της AChE. Συγκεκριμένα οι OPs είναι δομικά ανάλογα του υποστρώματος της ACh, και δρουν όπως το φυσικό υπόστρωμα που εισέρχεται στο ενεργό κέντρο και σχηματίζει ομοιοπολικό δεσμό με την υδροξυλομάδα της σερίνης. Όπως και στην ακετυλίωση, ο OP διασπάται και το ένζυμο φωσφορυλιώνεται. Ενώ το ακυλο ένζυμο υδρολύεται ταχέως προκειμένου να αναγεννηθεί το ελεύθερο ένζυμο, η αποφωσφορυλίωση είναι πολύ αργή (διάρκεια ημερών), και το φωσφορυλιωμένο ένζυμο δεν μπορεί να υδρολύσει το νευροδιαβιβαστή. Αυτό έχει σαν συνέπεια τη αύξηση της συγκέντρωσης της ACh στο συναπτικό χάσμα και επομένως την υπερ-διέγερση των νικοτινικών και μουσκαρινικών υποδοχέων του νευροδιαβιβαστή και την διαταραγμένη νευροδιαβίβαση. Τα τυπικά συμπτώματα οξείας δηλητηρίασης από OPs είναι η σύγχυση, μυϊκή αδυναμία, μυϊκοί σπασμοί, μύση, σιελόρροια, εφίδρωση. Σοβαρές δηλητηριάσεις μπορούν να οδηγήσουν σε αναπνευστική παράλυση, απώλεια των αισθήσεων, σπασμούς και/ή θάνατο. Η πλειοψηφία των OPs έχει χρησιμοποιηθεί ως μη εκλεκτικά εντομοκτόνα για περισσότερα από 50 χρόνια, προκειμένου να ελεγχθεί ο πληθυσμός των εντόμων στη γεωργία και στο οικιακό περιβάλλον. Η σύνθεση των OPs εντομοκτόνων σε μεγάλες ποσότητες ξεκίνησε μετά τον 2^ο Παγκόσμιο Πόλεμο και το

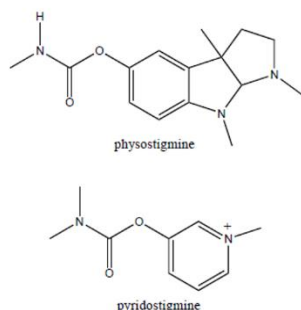
παραθείο ήταν ανάμεσα στα πρώτα που κυκλοφόρησαν στην αγορά, ακολουθούμενο από το μαλαθείο (malathion) και το αζινφός μεθύλ (azinphosmethyl). Στα πιο κοινώς χρησιμοποιούμενα OPs εντομοκτόνα συμπεριλαμβάνονται τα αιθυλ-παραθείο (ethyl parathion), μαλαθείο (malathion), μεθυλ-παραθείο (methyl parathion), διαζινόν (diazinon) κ.ά. Περί το 1970 τα οργανοχλωριούχα (organochlorine) εντομοκτόνα (DDT, dieldrin, heptachlor) απαγορεύθηκαν λόγω της παραμονής και της συγκέντρωσης στο περιβάλλον και αντικαταστάθηκαν από τα πιο ευκόλως διασπώμενα OPs. Παρόλο που τα OPs εντομοκτόνα αποσυντίθενται ταχέως, και αυτός ήταν ο λόγος που αποτέλεσαν την εναλλακτική επιλογή έναντι των οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων, προκαλούν ισχυρότερη οξεία τοξικότητα, κινδύνους δηλητηρίασης σε ανθρώπους που μπορεί να εκτεθούν σε μεγάλες ποσότητες όπως εργαζόμενοι στη βιομηχανία. Οι OPs αποτελούν μια από τις σημαντικότερες αιτίες δηλητηρίασης σε παγκόσμιο επίπεδο που επέρχονται σαν αποτέλεσμα γεωργικής χρήσης ή τυχαίας έκθεσης. Τα εντομοκτόνα αυτού του είδους μπορούν να απορροφηθούν από όλες τις οδούς όπως δια της εισπνοής, δια της κατάποσης και δια της διαδερμικής απορρόφησης. Η τοξικότητα τους όμως δεν περιορίζεται μόνο στην οξεία φάση αλλά χρόνιες επιδράσεις έχουν επίσης σημειωθεί. Συγκεκριμένα επαναλαμβανόμενη ή παρατεταμένη έκθεση σε OPs μπορεί να οδηγήσει στα ίδια συμπτώματα με αυτά της οξείας έκθεσης μαζί με καθυστερημένης εμφάνισης συμπτώματα. Οι επιδράσεις που ανέφεραν εργαζόμενοι οι οποίοι εκτέθηκαν επανειλημμένως σε αυτά συμπεριλαμβάνουν διαταραχή της μνήμης και της συγκέντρωσης, σοβαρή κατάθλιψη, ευερεθιστότητα, σύγχυση, πονοκέφαλο, δυσκολία στο λόγο, καθυστερημένους χρόνους απόκρισης, εφιάλτες και δυσκολία στον ύπνο. Οι νευροδιαβιβαστές όπως είναι η ACh αποτελούν υψίστης σημασίας παράγοντες για την ανάπτυξη του εγκεφάλου και πολλοί OPs που προκαλούν νευροτοξικά αποτελέσματα στους αναπτυσσόμενους οργανισμούς ακόμη και σε χαμηλά επίπεδα έκθεσης, οδηγούν σε ποικίλες ασθένειες του νευρικού και ανοσοποιητικού συστήματος. Οι OPs έχουν χρησιμοποιηθεί θεραπευτικά στην οφθαλμολογία και πιο συγκεκριμένα για την αντιμετώπιση του γλαυκώματος, μια ασθένεια των οφθαλμών όπου το οπτικό νεύρο καταστρέφεται με χαρακτηριστικό τρόπο. Η ασθένεια συνοδεύεται με υψηλή ενδοφθάλμια πίεση και μπορεί να οδηγήσει σε μόνιμη απώλεια της όρασης. OPs όπως diisopropyl fluorophosphate και echothiophate μπορούν να δράσουν ως παρασυμπαθομιμητικά, να αναστείλουν την AChE μη αντιστρεπτά και να προκαλέσουν μύση και πτώση της πίεσης.



Εικόνα 34. Καρβαμάτες

Μια σύντομη αναφορά γίνεται και για τις καρβαμάτες οι οποίες είναι οργανικά μόρια που προέρχονται από το καρβαμιδικό οξύ (NH₂COOH). Η δομή των βιοδραστικών καρβαματών φαίνεται στην Εικόνα 34 όπου -X μπορεί να είναι οξυγόνο ή θείο (θειοκαρβαμάτη), R₁ και R₂ είναι συνήθως οργανικοί ή αλκυλο υποκαταστάτες, αν και κάποιες φορές είναι δυνατόν να υπάρχει υδρογόνο σε αυτές τις θέσεις, και R₃ είναι τις περισσότερες φορές ένας οργανικός υποκαταστάτης ή λιγότερο συχνά μέταλλο. Εκτός από τη θεραπευτική τους εφαρμογή στον ανθρώπινο οργανισμό (Alzheimer, μασθένεια gravis, γλαύκωμα, Parkinson) έχουν χρησιμοποιηθεί και ως εντομοκτόνα, ως παρασιτοκτόνα στην κτηνιατρική και στην προφύλαξη από δηλητηρίαση με OPs. Όπως οι OPs έτσι και οι καρβαμιδικοί εστέρες, που αποτελούν AChEIs, προκαλούν οξείες τοξικές επιδράσεις και συμπτώματα δηλητηρίασης. Η θεμελιώδης διαφορά στην επαγόμενη ανασταλτική δράση ανάμεσα στους OPs και στους καρβαμιδικούς εστέρες είναι η σταθερότητα του σχηματιζόμενου συμπλόκου AChE-OP και αυτού της AChE και του καρβαμιδικού εστέρα. Συγκεκριμένα οι OPs είναι ικανοί να φωσφορυλιώνουν τις μονάδες σερίνης της AChE με μη αναστρέψιμο τρόπο ενώ η μονάδα της καρβαμυλιωμένης σερίνης είναι λιγότερο σταθερή και το κομμάτι καρβαμυλίου (carbamyl moiety) μπορεί να απελευθερωθεί από το ένζυμο μέσω άμεσης υδρόλυσης (χρόνος διάσπασης είναι 30-40 λεπτά). Για το λόγο αυτό οι καρβαμάτες θεωρούνται αντιστρεπτοί AChEIs. Επιπλέον οι καρβαμάτες, αναλογικά με τους OPs, αναστέλλουν αντιστρεπτά την εστεράση-στόχο νευροπάθειας (neuropathy target esterase, NTE) αλλά, αντίθετα από τους OPs, δεν είναι ικανές να απαλκυλιώνουν (dealkylate) δηλαδή να ωριμάζουν το ανεσταλμένο ένζυμο. Οπότε οι καρβαμάτες δεν αποτελούν επαγωγείς εκδήλωσης καθυστερημένης νευροπάθειας. Οι ουσίες αυτές επιδεικνύουν προστατευτικές δράσεις όταν χορηγούνται πριν από την εκδήλωση OPs επαγόμενης νευροπάθειας. Έτσι οι νευροπαθητικοί OPs δεν είναι ικανοί να αναστείλουν και να ωριμάσουν το ένζυμο εστεράση-στόχο νευροπάθειας η οποία προηγουμένως έχει αντιστρεπτά ανασταλεί από καρβαμάτες. Από την άλλη πλευρά οι καρβαμάτες ενεργοποιούν την εκδήλωση καθυστερημένης νευροπάθειας ή προκαλούν σοβαρότερη μορφή αυτής, όταν χορηγούνται κατόπιν εφαρμογής OP νευροπαθητικών δόσεων. Οι καρβαμάτες εμφανίζουν μυκητοκτόνο, εντομοκτόνο και παρασιτοκτόνο δράση και χρησιμοποιούνται στη γεωργία ενώ μαζί με τους OPs είναι τα δύο είδη εντομοκτόνων που αναστέλλουν τις χολινεστεράσες. Οι καρβαμάτες θεωρούνται ασφαλέστερες από τους OPs. Το φυσικό προϊόν φυσοστιγμίνη (Εικόνα 35) αποτελεί ένα καρβαμιδικό παράγωγο και

απομονώνεται από το φυτικό είδος *Physostigma venenosum* (Fabaceae) και χρησιμοποιείται ευρέως στην αντιμετώπιση της μυασθένειας gravis. Μειώνει το ρυθμό υδρόλυσης της ACh και συνεπώς αυξάνει τα επίπεδά του στο διαταραγμένο νευροσυναπτικό χάσμα βελτιώνοντας έτσι τη μεταβίβαση του νευρικού σήματος. Επιπροσθέτως η πυριδοστιγμίνη (Εικόνα 35) είναι ικανή να αποτρέψει τη μη αναστρέψιμη σύνδεση των OPs στην AChE. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιείται σαν προφύλαξη ενάντια στην τοξικότητα νευρικών παραγόντων. Η ριβαστιγμίνη είναι επίσης ένα καρβαμιδικό παράγωγο με πιθανώς την πιο αποτελεσματική φαρμακολογική εφαρμογή όσον αφορά την συμπτωματική αντιμετώπιση της ασθένειας Alzheimer και αναλύεται εκτενέστερα παρακάτω.



Εικόνα 35. Χημικές Δομές Φυσοστιγμίνης και Πυριδοστιγμίνης

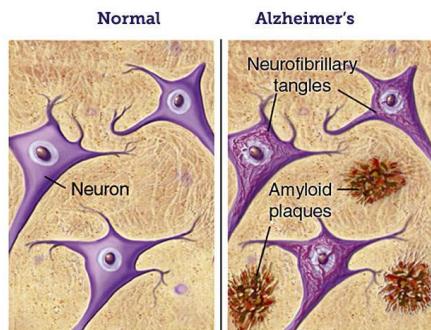
Η διαδικασία της γήρανσης έχει τραβήξει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας παγκοσμίως καθώς το προσδόκιμο ζωής του ανθρώπου ολοένα και αυξάνεται. Μια προφανής αρνητική συνέπεια της διαδικασίας γήρανσης είναι η αξιοσημείωτη αύξηση των ανθρώπων που πάσχουν από τη νόσο Alzheimer (50-75%) και από άλλες σχετικές μορφές άνοιας (περίπου 25%). Σύμφωνα με την Ένωση για το Alzheimer, η νόσος Alzheimer (AD) αποτελεί την πιο συχνή αιτία άνοιας των ηλικιωμένων, εφόσον βρίσκεται πίσω από τα 2/3 των περιστατικών. Μετά την ηλικία των 65 ετών, το ποσοστό των ανθρώπων που υποφέρουν από άνοια διπλασιάζεται περίπου κάθε πέντε χρόνια. Απασχολεί το 3% των ατόμων ηλικίας 65-74 ετών, το 19% των ατόμων ηλικίας 75-84 ετών και το 47% των ατόμων 85 ετών και πάνω. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ, WHO) έχει υπολογιστεί ότι ο αριθμός των πασχόντων από άνοια σε παγκόσμιο επίπεδο έφτασε τα 35.6 εκατομμύρια το 2010, ενώ σύμφωνα με προβλέψεις αυτός ο αριθμός πρόκειται να διπλασιαστεί σε 20 χρόνια και να φτάσει τα 65.7 εκατομμύρια, το 2030, ενώ το 2050 τα 115.4 εκατομμύρια⁶⁸. Η εκφύλιση των νευρώνων είναι μια εξελικτική διαδικασία η οποία ξεκινάει στο μέσο της ζωής ενώ φτάνει στο μέγιστο περίπου στα 70 έτη⁶⁹. Συνεπώς η αναζήτηση κατάλληλης

φαρμακοθεραπείας ενάντια στην AD απασχολεί μεγάλο ποσοστό ερευνητών. Η νόσος Alzheimer αναφέρθηκε πρώτη φορά το 1907 από το Γερμανό ψυχίατρο Alois Alzheimer ο οποίος περιέγραψε την περίπτωση μιας γυναίκας 51 ετών με άνοια, και την εύρεση μετά θάνατον χαρακτηριστικών μικροσκοπικών ευρημάτων, πλακών αμυλοειδούς και νευροϊνιδίων⁷⁰. Η AD αποτελεί μία νευροεκφυλιστική ασθένεια του ΚΝΣ η οποία χαρακτηρίζεται από τη σταδιακή απώλεια μνήμης του ασθενούς. Συνήθως ξεκινά με την προσωρινή απώλεια μνήμης και συνεχίζει με την εξάπλωση των συμπτωμάτων νοητικής και συναισθηματικής δυσλειτουργίας. Παρόλο που στην AD οι ασθενείς δεν εκδηλώνουν συμπτώματα κινητικής ή αισθητικής φύσεως, συγκεκριμένη άτυπη κλινική εικόνα (όπως σπαστική παραπάρεση) εντοπίζεται περιστασιακά σε κάποιους ασθενείς. Προκειμένου να διαγνωστεί επιτυχώς η νόσος, η δυσλειτουργία δεν πρέπει να περιορίζεται σε μια περίοδο έξαρσης (delirium) αλλά θα πρέπει να έχει εντοπιστεί για τουλάχιστον 6 μήνες ενώ δεν θα πρέπει να υφίσταται εναλλακτική εξήγηση. Χαρακτηριστικά οι AD ασθενείς εμφανίζουν νοητική σύγχυση, απώλεια μνήμης και διαταραχές συμπεριφοράς⁷¹.

Η αιτιολογία της ασθένειας φαίνεται να είναι ετερογενής και πολυπαραγοντική. Πίσω από την εκδήλωση της νόσου υπάρχουν διαταραχές σε μοριακό και γενετικό επίπεδο και παράγοντες όπως είναι η φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες. Οι αλλοιώσεις εντοπίζονται κυρίως στον υπόκαμπο, στον αμυγδαλοειδή πυρήνα και στον εγκεφαλικό φλοιό. Εγκεφαλικές βιοψίες και μελέτες αυτοψίας έχουν αποδείξει ξεκάθαρα ότι ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο έχουν μειωμένη δραστηριότητα του ενζύμου χολίνη ακετυλοτρανσφεράση του φλοιού, ένζυμο υπεύθυνο για τη σύνθεση της ACh από τη χολίνη. Τα επίπεδα του ενζύμου συσχετίζονται με τον αριθμό των νευριτικών πλακών και με τη βαθμολογία ασθενών στο σύντομο τεστ που ελέγχει τη νοητική κατάσταση (Mini-Mental State Exam, MMSE). Επιπλέον, μετά θάνατον μελέτες περιέγραψαν ένα μοτίβο χολινεργικής απονεύρωσης όπου παρατηρείται μείωση προσυναπτικών μουσκαρινικών υποδοχέων τύπου 1 και νικοτινικών υποδοχέων, με σύγχρονη σχετική διατήρηση των μετασυναπτικών μουσκαρινικών υποδοχέων τύπου 2⁷². Έχει επίσης δειχθεί ότι στην AD παρουσιάζεται απώλεια χολινεργικών νευρώνων στο βασικό πυρήνα του Magnert και σε άλλους υποφλοιικούς πυρήνες οι οποίοι χαρακτηρίζονται από τις διάχυτες φλοιώδεις προεξοχές τους⁷³. Αυτοί οι μεγάλοι νευρώνες είναι κυρίως υπεύθυνοι για τον εφοδιασμό του νευροδιαβιβαστή της ACh στον εγκεφαλικό φλοιό και παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της προσοχής και στην εκμάθηση νέων πραγμάτων. Πολλά χρόνια αργότερα, νευροπαθολογικές μελέτες αποκάλυψαν την παρουσία νευροϊνιδιακών τολυπίων στους ίδιους

νευρώνες⁷⁴. Οι πρωτεϊνικές εναποθέσεις (‘γεροντικές πλάκες’) παρατηρούνται στα ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά διαμερίσματα του εγκεφάλου. Οι ενδοκυτταρικές εναποθέσεις συνιστούν τα νευροϊνιδιακά τολύπια τα οποία κατασκευάζονται από νημάτια υπερφωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης Ταυ. Οι εξωκυτταρικές εναποθέσεις ή αλλιώς αμυλοειδείς πλάκες απαντώνται κυρίως στο νεοφλοιό (σκεπτόμενος εγκέφαλος) και περιέχουν ένα 4-kDa πολυπεπτιδίο γνωστό ως β-αμυλοειδή πρωτεΐνη (Αβ). Η Αβ πρωτεΐνη αποτελεί προϊόν μεταβολισμού ενός ακόμη μεγαλύτερου μεγέθους πρόδρομου μορίου γνωστό ως πρόδρομη β-αμυλοειδής πρωτεΐνη (APP, amyloid precursor protein), η οποία αρχικά διασπάται από το ένζυμο β-σεκρετάση ή αλλιώς BACE1 (b-site APP cleaving enzyme-1). Η β-σεκρετάση αποτελεί στόχο για την ανάπτυξη φαρμακευτικών παραγόντων που εμποδίζουν την παραγωγή Αβ πρωτεΐνης⁷⁴. Έχει γίνει προσπάθεια εξήγησης της εκλεκτικής απώλειας αυτών των μεγάλων χολινεργικών νευρώνων βασιζόμενη εν μέρει στην απώλεια της ασβεστιοδεσμευτικής πρωτεΐνης, καρβιδίνης-D28k κατά την διάρκεια της γήρανσης, καθιστώντας τους νευρώνες πιο ευάλωτους στα υψηλά ενδοκυτταρικά επίπεδα ασβεστίου. Εκτεταμένες φαρμακολογικές μελέτες σε ζώα και ανθρώπους απέδειξαν ότι οι χολινεργικοί ανταγωνιστές όπως είναι η σκοπολαμίνη εμπλέκονται στην ικανότητα μάθησης. Επιπροσθέτως, οι χολινεργικοί αγωνιστές έχει βρεθεί ότι είναι ικανοί να διευκολύνουν τη μάθηση, κάτι το οποίο στηρίζει τον σημαντικό φυσιολογικό ρόλο της ACh στην διατήρηση της προσοχής και στην ικανότητα μάθησης⁷⁵. Συνεπώς πολλές είναι οι θεραπευτικές προσεγγίσεις της AD και περιλαμβάνουν τον περιορισμό των πλακών β-αμυλοειδούς πρωτεΐνης αλλά και τη βελτίωση της λειτουργίας των συνάψεων. Κάποιες μελέτες μάλιστα αναφέρουν ότι θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης (oestrogen replacement therapy (ORT)) θα μπορούσε να συμβάλλει στην πρόληψη και αντιμετώπιση της AD καθώς υπάρχουν ενδείξεις ότι γυναίκες που έλαβαν ORT θεραπεία είχαν μικρότερο κίνδυνο ανάπτυξης AD ενώ γυναίκες που ήδη έπασχαν από AD και έλαβαν ORT παρουσίασαν βελτίωση της νοητικής τους λειτουργίας.

Normal vs. Alzheimer's Diseased Brain



© 2000 by BrightFocus Foundation

BrightFocus®
Foundation
Cure in Mind. Cure in Sight.

Εικόνα 36. Σύγκριση νευρώνων υγιούς και AD ασθενούς

Τα ένζυμα των χολινεστερασών απαντώνται στις σχηματιζόμενες πλάκες και η παρεμπόδιση της δραστηριότητάς τους με αναστολείς χολινεστερασών μπορεί να τροποποιήσει την εναπόθεση β-αμυλοειδών, σημείο κλειδί στην παθοφυσιολογία της AD όπως έχει περιγραφεί μέχρι σήμερα. Συγκεκριμένα, όσον αφορά τους νευροδιαβιβαστές είναι πλέον ξεκάθαρη η συμμετοχή τόσο των χολινεργικών όσο και των γλουταμινεργικών στην εξέλιξη της AD. Από τη μια πλευρά, η 'γλουταμινεργική υπόθεση' συνδέει τη νοητική έκπτωση των AD ασθενών με τη νευρωνική καταστροφή έχοντας ως αποτέλεσμα την υπερ-ενεργοποίηση των υποδοχέων του N-μεθυλο-D-ασπαρτικού (NMDA) από το γλουταμικό οξύ. Η συνεχής χαμηλού επιπέδου ενεργοποίηση των NMDA υποδοχέων, οι οποίοι είναι σημαντικοί για τη μάθηση και τη μνήμη, μπορεί να οδηγήσει, λόγω ελλείψεων, σε επαναπρόσληψη του γλουταμικού από τα αστρογλοιακά κύτταρα στη συναπτική σχισμή. Με βάση την υπόθεση αυτή έχει αναπτυχθεί η θεραπευτική στρατηγική των ανταγωνιστών των NMDA υποδοχέων όπως π.χ. η ουσία μεμαντίνη, για την αντιμετώπιση της AD.

Από την άλλη πλευρά, η ACh, νευροδιαβιβαστής απαραίτητος για τις διαδικασίες της μνήμης και της μάθησης, μειώνεται τόσο σε συγκέντρωση όσο και σε λειτουργικότητα στους AD ασθενείς. Αυτή η ανεπάρκεια σε συνδυασμό και με άλλες χολινεργικές ελλείψεις, συμπεριλαμβανομένης της απώλειας χολινεργικών νευρώνων και της μείωσης της δράσης της AChE, συνιστούν τη 'χολινεργική υπόθεση' της AD⁷⁶. Με βάση τη χολινεργική υπόθεση, ο απότομος αποκλεισμός της νευροδιαβίβασης είναι θανατηφόρος, ενώ η σταδιακή απώλεια αυτής, όπως για παράδειγμα στη νόσο Alzheimer, σχετίζεται με την έκπτωση γνωσιακών, αυτόνομων και νευρομυϊκών λειτουργιών⁷⁷. Γι' αυτό το λόγο η σύναψη είναι η σημείο κλειδί για

την ανάπτυξη και χρήση φαρμάκων σε ένα μεγάλο αριθμό εγκεφαλικών διαταραχών οι οποίες είναι σήμερα κατανοητές στο επίπεδο της συναπτικής νευροδιαβίβασης και της λειτουργικής οργάνωσης του εγκεφάλου. Για παράδειγμα, η σύναψη είναι ο στόχος φαρμακευτικής αγωγής σε ψυχιατρικές ασθένειες, όπως η σχιζοφρένεια και η κατάθλιψη αλλά και στις νευροεκφυλιστικές νόσους, όπως η AD, η πλάγια μυατροφική σκλήρυνση και η νόσος Parkinson. Κατά την εξέλιξη της νόσου Alzheimer υπάρχει απώλεια των χολινεργικών νευρώνων του πρόσθιου εγκεφάλου η οποία συνοδεύεται από την προοδευτική πτώση των επιπέδων της ακετυλοχολίνης. Σήμερα, τέσσερα στα πέντε εγκεκριμένα φάρμακα που ενδείκνυνται για την συμπτωματική αγωγή της AD είναι AChEIs. Η σύγχρονη θεραπευτική βασίζεται κυρίως στους AChEIs, καθώς αυτοί ενισχύουν τη χολινεργική διαβίβαση αν και έχουν μέτριες και παροδικές θεραπευτικές επιδράσεις. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει θεραπεία της νόσου και οι αντιστρεπτοί AChEIs που χρησιμοποιούνται θεραπευτικά αντιμετωπίζουν τα συμπτώματα που σχετίζονται με τη μνήμη, τη σκέψη, την ομιλία, την κρίση και άλλες λειτουργίες του εγκεφάλου. Συγκεκριμένα διαφορετικές φυσιολογικές διαδικασίες που συνδέονται με την AD προκαλούν βλάβες ή καταστρέφουν κύτταρα που παράγουν και χρησιμοποιούν ACh, με αποτέλεσμα να μειώνεται η διαθέσιμη ποσότητα που μεταφέρει τα μηνύματα στα άλλα κύτταρα. Τα φάρμακα που δρουν ως αναστολείς χολινεστερασών και αναστέλλουν συγκεκριμένα την AChE, διατηρούν τα επίπεδα της ACh μέσω της ελάττωσης του ρυθμού διάσπασής της. Όπως έχει περιγραφεί οι AChEIs ελαττώνουν τη βιοχημική διάσπαση της ACh στη συναπτική σχισμή, κάτι το οποίο αντισταθμίζει τη μείωση της χολινεργικής διαβίβασης που προκαλείται από την εκφύλιση των χολινεργικών νευρώνων και την ανεπάρκεια νικοτινικών υποδοχέων της ACh. Κανένα από τα φάρμακα δε φέρει ως ένδειξη την καθυστέρηση ή τη διακοπή της εξέλιξης της νόσου. Θεραπείες, οι οποίες σχετικά πρόσφατα έχουν εγκριθεί από τις αρμόδιες αρχές όπως ο Αμερικανικός Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) και ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (EMA), φέρουν ως ένδειξη τη βελτίωση της νοητικής λειτουργίας και της ποιότητας της ζωής ασθενών με AD. Στην κλινική πράξη η τακρίνη (tacrine) (Εικόνα 37) αποτέλεσε την πρώτη ουσία που επέφερε βελτίωση της νοητικής απόδοσης δρώντας ως AChEI (1993). Δυστυχώς σε μετέπειτα τυχαίοποιημένη ελεγχόμενη κλινική μελέτη διάρκειας 30 εβδομάδων, το φάρμακο επέδειξε σοβαρή ηπατοτοξικότητα. Έναν ακόμη περιορισμό της θεραπευτικής χρήσης της τακρίνης αποτέλεσε η ανάγκη συχνής πρόσληψης και η καθιέρωση μη εξυπηρετικού δοσολογικού σχήματος. Αυτοί οι προβληματισμοί ώθησαν την επιστημονική κοινότητα στην ανακάλυψη νέας γενιάς AChEIs. Η νέα γενιά AChEIs είναι σχετικά καλώς ανεκτή, στερείται ηπατοτοξικότητας και εξυπηρετεί τη

διαμόρφωση ενός ευκολότερα πραγματοποιήσιμου δοσολογικού σχήματος. Ανάμεσα στους διαφορετικού τύπου AChEIs, μόνο η δονεπεζίλη (donepezil), η ριβαστιγμίνη (rivastigmine) και η γαλανθαμίνη (galanthamine) έχουν δείξει ικανοποιητικά θεραπευτικά αποτελέσματα. Αυτές δρούν ως αντιστρεπτοί αναστολείς της AChE.

Η *δονεπεζίλη* (Εικόνα 37) αποτελεί εκλεκτικό AChEI και συνδέεται με τις τρυπτοφάνες και των δύο δευτερευόντων σημείων, (CAS) και (PAS), του ενζύμου επιδεικνύοντας όχι μόνο συμπτωματική αντιμετώπιση της AD αλλά και καθυστέρηση της απόθεσης των πλακών αμυλοειδούς. Το φάρμακο παράγεται από τις φαρμακευτικές εταιρείες Eisai και Pfizer και κυκλοφορεί με την εμπορική ονομασία Aricept (υδροχλωρική δονεπεζίλη). Παρά τις αρχικές θεραπευτικές ενδείξεις για την ανακουφιστική αντιμετώπιση μικρού έως μέτριου βαθμού AD, υπάρχουν κλινικές μελέτες που υποστηρίζουν τη βελτίωση της νοητικής λειτουργίας ακόμη και σε σοβαρότερες περιπτώσεις AD ασθενών. Οι κύριες ανεπιθύμητες ενέργειες της δονεπεζίλης είναι γαστρεντερικές διαταραχές όπως ναυτία, διάρροια, ανορεξία, κοιλιακό άλγος καθώς επίσης βραδυκαρδία.

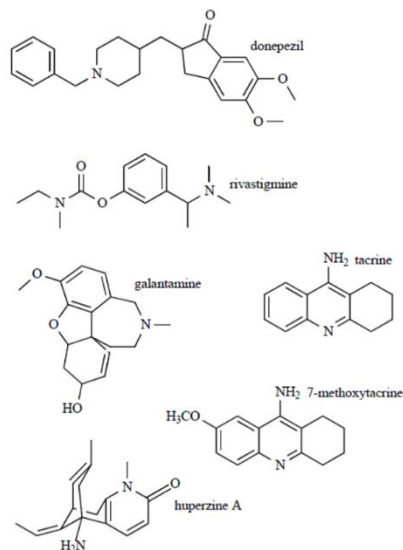
Η *ριβαστιγμίνη* (Εικόνα 37) (κυκλοφορεί με την εμπορική ονομασία Exelon) αποτελεί έναν δραστικό, βραδέως αναστρέψιμο καρβαμιδικό αναστολέα ο οποίος εμποδίζει τη δράση της χολινεστεράσης μέσω σύνδεσής της με τη σερίνη του εστερατικού τμήματος (CAS) του ενεργού κέντρου. Αποτελεί παράγωγο του αλκαλοειδούς φυσοστιγμίνη. Σε αντίθεση με τη δονεπεζίλη η οποία εκλεκτικά αναστέλλει την AChE, η ριβαστιγμίνη αναστέλλει εξίσου και την BuChE και την AChE. Φέρει έγκριση για την αντιμετώπιση ελαφριάς έως μέτριας μορφής AD σε 60 χώρες συμπεριλαμβανομένων των κρατών-μελών της Ευρωπαϊκής Ένωσης και των Ηνωμένων Πολιτειών. Πρόωρη και συνεχιζόμενη θεραπεία της AD με ριβαστιγμίνη μεγιστοποιεί τα παρατηρούμενα οφέλη για την υγεία του ασθενούς τα οποία έχουν να κάνουν με το ρυθμό μείωσης της νοητικής λειτουργίας, τις δραστηριότητες της καθημερινότητας και τη σοβαρότητα της άνοιας. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες περιλαμβάνουν και σε αυτήν την περίπτωση ναυτία, έμετο, διάρροια, ανορεξία, πονοκέφαλο, κοιλιακό πόνο και ζάλη. Ωστόσο τα διαδερμικής χορήγησης σκευάσματα της ριβαστιγμίνης μπορούν να επιφέρουν τα ίδια θεραπευτικά αποτελέσματα χωρίς να διαταράσσουν τη λειτουργία του γαστρεντερικού συστήματος.

Η *γαλανθαμίνη* (Εικόνα 37) (κυκλοφορεί με την εμπορική ονομασία Reminyl) είναι ένα τριτοταγές αλκαλοειδές το οποίο δρα ως εκλεκτικός, ανταγωνιστικός και ταχέως αντιστρεπτός

AChEI. Και αυτή η ουσία όπως οι παραπάνω ενδείκνυται για ελαφριά έως μέτρια μορφή της νόσου. Αποτελεί φυσικό προϊόν. Έχει απομονωθεί από τους βολβούς και τα άνθη του είδους *Galanthus caucasicus* (Caucasian snowdrop), *Galanthus woronowii* (Voronov's snowdrop) και από κάποια άλλα μέλη της οικογένειας Amaryllidaceae όπως το *Narcissus*, *Leucojum aestivum* (snowflake) και *Lycoris radiata* (red spider lily). Παράγεται και συνθετικά. Η πορεία ανάπτυξης της γαλανθαμίνης ως ευρέως χρησιμοποιούμενο φάρμακο για την αντιμετώπιση της AD μπορεί να χωριστεί σε τρεις κύριες περιόδους: την πρώιμη ανάπτυξη στην Ανατολική Ευρώπη για χρήση στη θεραπεία της πολυομυελίτιδας, την προ-κλινική ανάπτυξη το 1980 και τη μετέπειτα κλινική ανάπτυξη το 1990. Το 1996 η εταιρεία Sanochemia Pharmazeutika στην Αυστρία ήταν η πρώτη που κυκλοφόρησε τη γαλανθαμίνη με την εμπορική ονομασία Nivalin για την αντιμετώπιση της AD⁷⁵. Οι μελέτες γύρω από τη θεραπευτική της αξία ξεκίνησαν στη Σοβιετική Ένωση το 1950. Απομονώθηκε ως το υπεύθυνο βιοδραστικό συστατικό, ταυτοποιήθηκε και μελετήθηκε κυρίως ως προς τη σχέση της με το ένζυμο της AChE και την ικανότητα αναστολής αυτού. Η πρώτη βιομηχανική διαδικασία παραγωγής της αναπτύχθηκε το 1959. Έχει δειχθεί ότι αντιδρά με το ανιονικό δευτερεύον σημείο (PAS) καθώς επίσης και με την την ακυλο κοιλότητα (acyl-binding pocket). Επιπροσθέτως το φάρμακο αποτελεί ένα αλλοστερικό πρόσδεμα επί των νικοτινικών χολινεργικών υποδοχέων το οποίο επάγει την διαφοροποίησή τους. Η γαλανθαμίνη αντιδρά με το νικοτινικό υποδοχέα σε σημεία πρόσδεσης τα οποία είναι διαφορετικά από αυτά της ACh και των νικοτινικών αγωνιστών, και δρα ειδικά για να ενισχύσει τη δραστηριότητα (να ευαισθητοποιήσει) των νικοτινικών υποδοχέων στην παρουσία της ACh. Καθώς η σοβαρότητα της νοητικής διαταραχής στην AD σχετίζεται με την απώλεια νικοτινικών υποδοχέων, αυτή η επίδραση της γαλανθαμίνης φαίνεται να είναι ευεργετική για την αντιμετώπιση της δυσλειτουργίας. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες του φαρμάκου είναι όμοιες με τις προαναφερθείσες για τα άλλα φάρμακα και έχουν να κάνουν κυρίως με το γαστρεντερικό σύστημα. Καθώς η γαλανθαμίνη έχει αλλοστερική ενισχυτική επίδραση επί των νικοτινικών υποδοχέων, επηρεάζει όχι μόνο τη χολινεργική νευροδιαβίβαση αλλά και άλλα νευροδιαβιβαστικά συστήματα όπως μονοαμίνες, γλουταμικό και γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) μέσω του αλλοστερικού της μηχανισμού. Κατ' αυτόν τον τρόπο μπορεί να αποτελεί μια πιο αποτελεσματική φαρμακοθεραπεία η οποία βελτιώνει τη νοητική δυσλειτουργία ενώ συμβάλλει στην αντιμετώπιση ψυχιατρικών διαταραχών όπως σχιζοφρένεια, κατάθλιψη, διπολική διαταραχή και εθισμό από αλκοόλ. Συμβάλλει ακόμη στην αντιμετώπιση διαταραχών όπως η μυάσθενεια, η μυοπάθεια, η μυϊκή δυστροφία και η αισθητική και κινητική δυσλειτουργία που σχετίζονται με

διαταραχές του ΚΝΣ.

Η δονεπεζίλη έχει αποδειχθεί ότι είναι η πιο καλώς ανεκτή θεραπεία από τις τρεις με τις λιγότερες γαστρεντερικές διαταραχές. Πέρα από τα εγκεκριμένα φάρμακα για την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της νόσου υπάρχουν και άλλες ουσίες που βρίσκονται σε στάδιο μελετών όπως το παράγωγο της ηπατοτοξικής τακρίνης, *7-μεθοξυ τακρίνη* (Εικόνα 37) η οποία έχει δείξει *in vivo* και *in vitro* απενεργοποίηση της AChE με μικρότερη τοξικότητα. Το φυσικό αλκαλοειδές *υπερζίνη Α* (Εικόνα 37) προέρχεται από το είδος *Huperzia serrata* (Lycopodiaceae) ενώ επίσης μπορεί να συντεθεί. Ο μοριακός στόχος της υπερζίνης Α, η οποία συνιστά AChEI, είναι το περιφερειακό ανιονικό τμήμα, το οποίο επιτρέπει στο φάρμακο να επιδρά τόσο στα συμπτώματα όσο και στην αιτία της διαταραχής. Εμφανίζει ισχυρότερη δράση συγκρινόμενη με την τακρίνη, τη ριβαστιγμίνη και τη γαλανθαμίνη αλλά όχι με τη δονεπεζίλη. Κλινικές μελέτες απέδειξαν ότι η υπερζίνη Α επιδεικνύει επιδιορθωτικές ικανότητες της νοητικής λειτουργίας σε AD ασθενείς, στη σχιζοφρένεια και στην αγγειακή άνοια, καθώς επίσης και στην επιδιόρθωση της μνήμης ηλικιωμένων ανθρώπων. Επιπλέον τα *αλκαλοειδή της πρωτοβερβ(ε)ρίνης* (π.χ. βερβερίνη, παλματίνη, επιβερβερίνη), ως φυσικής προέλευσης AChEIs, αποτελούν μια υποσχόμενη συμπτωματική θεραπεία της AD. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι τα ευτομερή (eutomer) (βιοδραστικό εναντιομερές ή εναντιομερές που φέρει υψηλότερη φαρμακολογική δραστηριότητα) και τα δυστομερή (distomer) (αντίθετο του eutomer) των ρακεμικών (chiral) παραγώγων (π.χ. δονεπεζίλη, ριβαστιγμίνη, γαλανθαμίνη) διαφέρουν. Γενικά, το βασικό μειονέκτημα των AChEIs κατά την αντιμετώπιση του AD είναι τα μέτριο βαθμού και παροδικά οφέλη τα οποία διαρκούν το μέγιστο 12-24 μήνες. Συγκεκριμένα αυτά τα φάρμακα δεν είναι ικανά να μειώσουν το ρυθμό απώλειας των νοητικών ή λειτουργικών ικανοτήτων για μεγάλο χρονικό διάστημα. Εντούτοις αντιστρεπτοί AChEIs παρέχουν ουσιώδη συμπτωματικά οφέλη και για το λόγο αυτό παραμένουν ως κύρια φαρμακοθεραπεία της AD^{78 79 80}. Τέλος οι σύγχρονες μελέτες δείχνουν ότι η εύρεση και η ανάπτυξη νέων δομών που λειτουργούν ως AChEIs, έχοντας υψηλή αποτελεσματικότητα και εκλεκτικότητα που διασφαλίζει τις λιγότερες δυνατές ανεπιθύμητες ενέργειες, δρώντας ιδανικά και σε άλλα σημεία του χολινεργικού διαβιβαστικού συστήματος, εξακολουθεί να αποτελεί μια επιτακτική ανάγκη.



Εικόνα 37. Αντιστρεπτοί αναστολείς της AChE που χρησιμοποιούνται ως φαρμακοθεραπεία της AD

Φυτικά εκχυλίσματα και απομονωμένοι δευτερογενείς μεταβολίτες που προέρχονται από την παραδοσιακή θεραπευτική της Ιαπωνίας, της Κίνας, της Ευρώπης και της Αγιουβέρδα έχουν συνεισφέρει στην ανακάλυψη νέων παραγόντων για τη διαχείριση της AD. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η προσέγγιση της Κινεζικής Παραδοσιακής Θεραπευτικής (TCM) σύμφωνα με την οποία τα συστατικά ενός φυτικού εκχυλίσματος μπορούν να δρουν συνεργιστικά μεταξύ τους αλλά και να ενισχύουν τη δράση συστατικών που προέρχονται από άλλα φυτικά εκχυλίσματα και για το λόγο αυτό συχνά χορηγούνται μείγματα (συνταγές) πολλών φυτικών εκχυλισμάτων. Πέρα από τα ήδη αναλυμένα θεραπευτικά φυτικά είδη και προϊόντα αυτών αξίζει να σημειωθούν η ικανότητα των αιθερίων ελαίων από τα είδη *Melissa officinalis* και *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) να αναστέλλουν την AChE ερυθροκυττάρων *in vitro*, η δραστηριότητα των μονοτερπενίων 1,8-κινεόλη, γερανιόλη, λιμονένιο, α-πινένιο χωρίς όμως να μπορούν να διεξαχθούν συμπεράσματα για τη σχέση δομής δράσης μονοτερπενίων - AChE. Το αλκοολικό εκχύλισμα του είδους *Angelica archangelica* (Apiaceae) αναστέλλει την AChE *in vitro*. Το εκχύλισμα του *Ginkgo biloba* (Coniferae), EGb 761, έχει επιδείξει ευεργετική επίδραση στην εγκεφαλική κυκλοφορία και στο μεταβολισμό των νευρικών κυττάρων, στο μουσκαρινικό χολινεργικό σύστημα καθώς επίσης και αντιοξειδωτική δράση. Η ευεργετική επίδραση του φυτού στην εγκεφαλική λειτουργία είναι μια παλιά πληροφορία η οποία πηγάζει από το Ιράν και τη δυτική ιατρική του 1960. Το EGb 761 αποτελεί νευροπροστατευτικό παράγοντα ενάντια της αμυλοειδικής εναπόθεσης και της επαγόμενης από NO τοξικότητας *in vitro* ενώ εμφανίζει κυτταροτοξικότητα *in vitro* και *in vivo*. Έχει δειχθεί ότι μειώνει τη νοητική έκπτωση σε επίμυες

που πάσχουν από επαγόμενη από σκοπολαμίνη αμνησία, βελτιώνει τη διατήρηση της μνήμης σε νεαρούς και ηλικιωμένους επίμυες και αυξάνει τη μνήμη μικρής διάρκειας σε μύες. Υπεύθυνα δραστικά συστατικά πιθανόν αποτελούν τα αγγειοδιασταλτικά флаβονοειδή ή ο γκινγκολίδης Β που δρα ως παρεμποδιστής του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF). Το φασκόμηλο είναι ένα είδος το οποίο φέρει τη φήμη του ευεργετικού βοτάνου για τη μνήμη σε πολλές αναφορές ήδη από τα τέλη του 16^{ου} αιώνα. Ένα αιθανολικό εκχύλισμα, το αιθέριο έλαιο που παραλαμβάνεται με απόσταξη μεθ' υδρατμών του είδους *Salvia officinalis* (Labiatae) και το έλαιο από τη *S. lavandulaefolia* (Labiatae) έχουν εξεταστεί ως προς την ικανότητα αναστολής της AChE. Έχει δειχθεί ότι και τα τρία είδη αναστέλλουν την AChE σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις. Αυτή η πληροφορία αποτέλεσε σημαντικό σταθμό στην ιστορία των AChEIs καθώς προσέφερε νέα χημική κατηγορία πέρα από τα ήδη γνωστά φυτικής προέλευσης αλκαλοειδή. Η αντιχολινεστερασική δράση του ελαίου του είδους *S. lavandulaefolia* πιθανόν αποδίδεται στα μονοτερπένια 1,8-κινεόλη και α-πινένιο, τα οποία παρουσίασαν ανασταλτική δράση ενάντια στην AChE *in vitro* με ίσως πιθανή τη συνέργεια και με άλλα συστατικά του ελαίου. Παρόλ' αυτά μέχρι στιγμής τα μονοτερπένια είναι σαφώς ασθενέστερα συγκριτικά με τα αλκαλοειδή όπως η φυσοστιγμίνη⁸¹.

Μια άλλη προσέγγιση για την αποφυγή εκδήλωσης ή εξέλιξης της AD συνιστά η νευροπροστασία. Ο όρος γίνεται αντιληπτός ως ο τρόπος πρόληψης/προστασίας της καταστροφής των νευρώνων, ως προς τη δομή και τη λειτουργία τους, εντός μικρότερης (οξεία καταστροφή νευρώνων, εγκεφαλικό τραύμα) ή μεγαλύτερης (χρόνια βλάβη, νευροεκφυλιστική διαταραχή) χρονικής περιόδου. Κατά αυτόν τον τρόπο οι έννοιες πρόληψη, διάσωση και επιδιορθωτικοί μηχανισμοί νευρωνικής διαταραχής μπορούν να διακριθούν σαφώς μεταξύ τους, και να υπογραμμιστεί ότι καθένας επιφέρει μια ισχυρή επίδραση στη βιωσιμότητα των νευρώνων μέσα στο χρόνο. Ερευνητικούς στόχους για την ανάπτυξη νευροπροστατευτικών παραγόντων έχουν αποτελέσει κατά καιρούς το οξειδωτικό στρες, η κυτταροτοξικότητα, ή ο συνδυασμός των δύο παρέχοντας άμεση νευροπροστασία στον αντίποδα της έμμεσης νευροπροστασίας μέσω τροποποίησης μηχανισμών φλεγμονής. Η νευροπροστασία λοιπόν σημαίνει τη διατήρηση της βλάβης/διαταραχής των νευρώνων και της γλοίας κάτω από το κατώφλι εκδήλωσης συμπτωματολογίας⁸². Η ανάπτυξη νευροπροστατευτικών παραγόντων προϋποθέτει την εύρεση κατάλληλων βιοδεικτών και παραγόντων στόχων. Κατά μια άλλη προσέγγιση οι στρατηγικές νευροπροστασίας στη νόσο Alzheimer περιλαμβάνουν

συμπτωματική αγωγή προκειμένου να ελαττωθεί ο ρυθμός εξέλιξης της νόσου σε όσους ήδη πάσχουν (στάδιο ανίχνευσης, διάγνωση άνοιας (παθογένεση)), δευτερογενή πρόληψη προκειμένου να καθυστερήσει η εμφάνιση της νόσου σε όσους εμφανίζουν λανθάνουσα παθολογία (λανθάνων στάδιο, ήπια νοητική έκπτωση) και πρωτογενή πρόληψη για την αποτροπή εμφάνισης της AD σε άτομα που δεν εμφανίζουν παθολογία σε λανθάνουσα μορφή (στάδιο επαγωγής χωρίς κλινικά συμπτώματα). Μία κύρια οδός πρόληψης της AD είναι η τροποποίηση των παραγόντων που προκαλούν νευρωνικό τρυματισμό. Οι διαδικασίες βιολογικής γήρανσης, όπως οξειδωτική καταπόνηση, αγγειοεγκεφαλική ανεπάρκεια και περιβαλλοντικοί βλαπτικοί παράγοντες είναι δεκτικές σε παρεμβάσεις. Άλλη κύρια οδός είναι η προαγωγή της επιδιόρθωσης και των αναγεννητικών μηχανισμών. Γενικά επικρατεί η αντίληψη της ανάγκης ενός 'κοκτέιλ' φαρμάκων για τη θεραπεία της νόσου στο οποίο θα συνυπάρχουν ρυθμιστές νευροδιαβιβαστών, παράγοντες που μειώνουν την εναπόθεση Αβ αμυλοειδούς και πρωτεΐνης Ταυ, νέας γενιάς φάρμακα (π.χ. ανοσοθεραπεία) ενώ θα εξασφαλίζονται η νευροπροστασία και η πρόληψη παραγόντων κινδύνου.

[Το εθνοφαρμακολογικό παράδειγμα της γαλανθαμίνης](#)



Εικόνα 38. *Galanthus sp.*

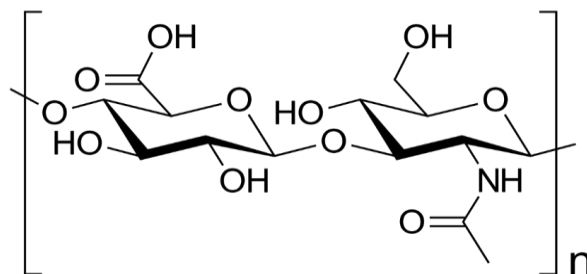
Η πρώτη καταγεγραμμένη αναφορά της αντιχολινεστερασικής δράσης της γαλανθαμίνης πιστεύεται ότι απαντάται σε απόσπασμα της Οδύσσειας όπου ο Ερμής δίνει στον Οδυσσέα το μώλυ ως αντίδοτο ενάντια στο δηλητήριο της Κίρκης καθώς εκείνος πήγαινε να συναντήσει τους συντρόφους του. Θεωρείται ότι το κύριο συστατικό στο μείγμα των φαρμάκων της Κίρκης ήταν το στραμώνιο που προέρχεται από το κοινό φυτικό είδος *Datura stramonium* (Solanaceae) και ότι αυτό προκάλεσε τη λήθη στους άντρες του Οδυσσέα οι οποίοι μάλιστα περιήλθαν σε μια παραισθησιογόνο κατάσταση (μετατράπηκαν σε χοίρους). Η ψυχοτρόπος δράση του παραπάνω

φυτικού είδους που περιέχει αντιχολινεργικά αλκαλοειδή όπως και τα είδη *Atropa belladonna* (Solanaceae) και *Hyoscyamus niger* (Solanaceae) φαίνεται ότι ήταν γνωστή στους αρχαίους Έλληνες. Η απώλεια της μνήμης και η παραισθησιογόνος επίδραση, όπως περιγράφονται από τον Όμηρο, συνιστούν πράγματι συμπτώματα αντιχολινεργικού συνδρόμου τα οποία εμφανίζονται μετά από δηλητηρίαση με αυτά τα αλκαλοειδή και άλλα σύγχρονα αντιχολινεργικά μόρια. Ο Όμηρος υπήρξε σαφής ότι το μώλυ λαμβανόταν ως ειδικό αντίδοτο στο δηλητήριο της Κίρκης. Το μώλυ με βάση την περιγραφή που γίνεται στην Οδύσσεια ταιριάζει σε μεγάλο βαθμό με το γνωστό *Galanthus nivalis* (γάλανθος ο χιονώδης) ενώ υπάρχει και η ιδέα του ελλέβορου. Τα στοιχεία που υποστηρίζουν την πρώτη σκέψη αναλύονται ακολούθως. Το σημείο συλλογής όπου ο Ερμής μάζεψε το φυτό είναι μια ρεματιά και ο γάλανθος είναι γνωστό ότι προτιμά να αναπτύσσεται σε υγρά προστατευόμενα εδάφη. Πρόκειται για ένα μικρό δυσδιάκριτο φυτικό είδος, το οποίο ανθίζει στις αρχές της άνοιξης, συνεπώς θα ήταν δύσκολο να το βρεις στην φυσική του κατάσταση. Πιο συγκεκριμένα φέρει άνθη λευκά, στο χρώμα του γάλατος, από όπου έχει πάρει και το όνομά του το φυτό *Galanthus* (gala=γάλα, anthus=άνθος). Τέλος η ρίζα έχει όντως σκούρο χρώμα και ξεριζώνεται δύσκολα όπως περιγράφει ο Όμηρος. Ακόμη, το λουλούδι αυτό είναι γνωστό ότι φύεται στη Βαλκανική περιοχή, συμπεριλαμβανομένης της ηπειρωτικής Ελλάδας και των ελληνικών νήσων. Μετά τον Όμηρο, ο Θεόφραστος (371 π.Χ. – 287 π.Χ.) έδωσε επιπλέον βοτανικές περιγραφικές πληροφορίες γύρω από το ομηρικό φυτικό είδος μώλυ στο έργο του *Historia Plantarum* ενώ ο Διοσκουρίδης, τέσσερις αιώνες μετά, περιγράφει το είδος μώλυ χωρίς όμως να το ταυτίζει με το ομηρικό μώλυ. Επίσης δίνει αναλυτική περιγραφή της εικόνας του είδους λευκοϊόν (*Leucojum bulbosum*) και τις διαφορές του από το *Galanthus* καθώς συχνά υπήρχε ταύτιση των ειδών.⁸³ Τα κλασικά ιατρικά-βοτανικά κείμενα του 16^{ου} αιώνα (Fuchs, Bock και Brunfels) δεν κάνουν αναφορά στο είδος *Galanthus nivalis* αλλά πρόχειρα επισημαίνουν το είδος *Leucojum*. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο Γερμανός φαρμακογνώστης Madaus (1938) ο οποίος δεν αναφέρει κανένα από τα δύο είδη και περιγράφει μόνο το είδος *Narcissus pseudonarcissus* στο οποίο δίνει κάποιες χρήσεις χωρίς κάποια να αφορά το ΚΝΣ. Από τις πληροφορίες αυτές συμπεραίνουμε ότι το *Galanthus* και τα άλλα γένη της οικογένειας Amaryllidaceae δεν χρησιμοποιούνταν κάπως συγκεκριμένα και συχνά στην ευρωπαϊκή θεραπευτική. Σύμφωνα με μη επιβεβαιωμένες πηγές, περί το 1950, ένας Βούλγαρος φαρμακολόγος παρατήρησε τη χρήση του κοινού γάλανθου του χιονώδη από ιθαγενείς οι οποίοι το έτριβαν στο πρόσθιο τμήμα του εγκεφάλου για να ανακουφιστούν από το νευρόπονο. Επίσης μεταγενέστερες μελέτες επισήμαναν τη χρήση του είδους στην Ανατολική Ευρώπη όπως

Ρουμανία, Ουκρανία, Βαλκανική χερσόνησο, Ανατολικές Μεσογειακές χώρες. Παρόλα αυτά δεν είναι δυνατόν να αναδειχθεί κάποια ξεκάθαρη εθνοβοτανική μελέτη. Μάλιστα στην πρώτη φαρμακολογική δημοσίευση της γαλανθαμίνης δεν γίνεται παραπομπή σε παραδοσιακή χρήση του φυτικού είδους από τους Καυκάσιους. Πλέον τα είδη έχουν χρησιμοποιηθεί για περίπου 40 χρόνια με στόχο την αναστροφή της νευρομυϊκής απόκλεισης και για την αντιμετώπιση νευρολογικών διαταραχών όπως μεταπολυομυελιτιδικό σύνδρομο και μυσθένεια gravis. Μια ενδιαφέρουσα αναφορά πηγάζει από τον Άγγλο φαρμακογώστη E.J. Shellard (2000) ο οποίος αναπαράγει μια παρουσίαση του 1965, Ρώσου φαρμακογνώστη, που περιγράφει μια γυναίκα της υπαίθρου η οποία ζούσε στους πρόποδες των Καυκασίων ορέων (Νότια Ρωσία, Γεωργία) και η οποία, όταν τα νεαρά παιδιά της παρουσίαζαν συμπτώματα ασθένειας που ομοιάζουν με αυτά της πολυομυελίτιδας, τους έδινε ένα αφέψημα βολβών του είδους *Galanthus woronowii* Los και τότε τα παιδιά της επανέρχονταν πλήρως χωρίς σημάδια παράλυσης. Αυτό αποτελεί μία από τις πολλές διαθέσιμες αναφορές που έχουν διασωθεί μέσω δεύτερου προσώπου και περιγράφουν τη θεραπευτική χρήση του *Galanthus* προτού η γαλανθαμίνη πάρει την έγκριση αντιχολινεστερασικού φαρμάκου. Το παράδειγμα της γαλανθαμίνης με τις συγκεκριμένες εθνοβοτανικές πηγές αναδεικνύει το πόσο δύσκολο είναι να καθιερωθεί μια παραδοσιακή θεραπευτική χρήση όταν ελάχιστες πληροφορίες είναι διαθέσιμες στο κοινό και όταν δεν υπάρχει σαφής κανονισμός που διέπει τη διαδικασία αξιοποίησης της πληροφορίας από αυτούς που την παρέχουν προς αυτούς που την αξιοποιούν προς όφελος τους⁷⁵.

6.4 Υαλουρονιδάση

6.4.1 Γενικά



Εικόνα 39. Υαλουρονικό οξύ (HA)

Οι Meyer και Palmer ήταν οι πρώτοι που παρέλαβαν σε καθαρή βιοχημικά μορφή το υαλουρονικό οξύ (HA, hyaluronan) (Εικόνα 39) από βόειο υαλώδες υγρό ενώ η χημική του δομή αποδόθηκε το 1954. Το HA συνιστά έναν υψηλού μοριακού βάρους, χωρίς θείο, αρνητικά

φορτισμένο, γραμμικό, όξινο πολυσακχαρίτη (γλυκοζαμινογλυκάνη) που αποτελείται από επαναλαμβανόμενες ομάδες β-D-γλυκουρονικού οξέος-(1→3)-β-N-ακετυλο-D-γλυκοζαμινοδισακχαρίτη (υαλοβιουρονικό οξύ, hyalobiuronic acid) οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με β-1,4 δεσμούς⁸⁴. Παρότι ανήκει στην κατηγορία των γλυκοζαμινογλυκανών (GAG) διαφέρει από αυτές. Το HA είναι μία ουσία με τυπικό μοριακό βάρος ανάμεσα στα $\sim 2 \times 10^5$ και $\sim 10 \times 10^7$ Da και μήκος σε πλήρη έκταση 2-25 μm. Ανίθετα οι άλλες GAGs είναι σχετικά μικρότερες σε μέγεθος (<50 kDa, συνήθως 15-20 kDa) με μικρού μήκους αλυσίδα. Επίσης το HA συντίθεται στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης του πλάσματος ως ένα ελεύθερο γραμμικό πολυμερές χωρίς κανένα πρωτεϊνικό κορμό, ενώ άλλες GAGs συντίθενται από έζυμα του συμπλέγματος Golgi και συνδέονται ομοιοπολικά με πρωτεϊνικό κορμό. Η βιοσύνθεση του HA ρυθμίζεται από τρία διαμεμβρανικά ισοένζυμα γλυκοσυλοτρανσφεράσης: HAS1, HAS2 και HAS3. Εντοπίζεται σε όλο το ζωικό βασίλειο και είναι άφθονο στην εξωκυττάρια ύλη (extracellular matrix, ECM) μαλακών συνδετικών ιστών⁸⁵. Ανάλογα με τον ιστό από όπου προέρχεται, το πολυμερές συνήθως αποτελείται από 2.000 – 25.000 μονάδες δισακχαρίτη οι οποίες επιτελούν ποικίλες λειτουργίες. Βρίσκεται ακόμη στην επιφάνεια συγκεκριμένων παθογόνων βακτηρίων *Streptococcus* και *Pasteurella*. Στα θηλαστικά υψηλή συγκέντρωση HA βρίσκεται στους συνδετικούς ιστούς όπως είναι ο ομφάλιος λώρος, το δέρμα (επιδερμίδα, δερμίδα), το αρθρικό υγρό, το υαλώδες υγρό αλλά και στον εγκέφαλο και στο ΚΝΣ^{86 87}.

Το HA είναι υπεύθυνο για τρεις βασικές μοριακές διαδικασίες. Πρώτον, αλληλεπιδρά με έναν αυτοκρινή τρόπο με την κυτταρική επιφάνεια υποδοχέων HA στο ίδιο κύτταρο. Δευτερευόντως, αλληλεπιδρά με έναν παρακρινή τρόπο με μια ποικιλία μορίων της ECM σε γειτονικά κύτταρα. Λόγω της τεράστιας φυσικής δομής του, το HA είναι ικανό να αλληλεπιδρά με περισσότερα από ένα κύτταρα της ECM. Τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις έχει δειχθεί ότι είναι απαραίτητες στην κατασκευή και συναρμολόγηση διαφόρων ιστών. Ένα μεμονωμένο πολυμερές HA μπορεί να συνδέεται με εκατοντάδες ECM πρωτεϊνών, οι οποίες με τη σειρά τους συνδέονται επιπλέον με άλλες πρωτεΐνες. Αυτά τα μεγάλα σύμπλοκα μπορούν επίσης να συνδεθούν με την κυτταρική επιφάνεια μέσω HA υποδοχέων. Τρίτον, πρόσφατα συντεθειμένο HA μπορεί να εκκριθεί και ακολούθως να αλληλεπιδράσει με διάφορους υποδοχείς που βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου συμπεριλαμβανομένων των καθοριστικού συμπλέγματος 44 (CD44, cluster determinant 44), του υποδοχέα για την κινητικότητα που μεσολαβεί το HA (RHAMM, receptor for hyaluronate-mediated motility), του υποδοχέα HA του ενδοθηλίου λεμφικού

αγγείου (LYVE-1, lymphatic vessel endothelial HA receptor), του υποδοχέα HA για την ενδοκύττωση (HARE, hyaluronan receptor for endocytosis), του υποδοχέα LEC (LEC receptor, liver endothelial cell clearance receptor) και TLR-4 (Toll-like receptor 4). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις μεσολαβούν σε τρεις σημαντικές φυσιολογικές διαδικασίες: στη μεταγωγή σήματος, στο σχηματισμό περικυτταρικού καλύμματος και στην εσωτερίκευση με τη μεσολάβηση υποδοχέων. Η ετερογενής ομάδα πρωτεϊνών που έχουν την ικανότητα να συνδέονται με το HA ονομάζονται υαλουρονοπροσκολλητίνες (hyaladherins)⁸⁸. Το υαλουρονικό οξύ δρα ως ελεύθερος υδατάνθρακας και αλληλεπιδρά με θειωμένες πρωτεογλυκάνες μέσω πρωτεϊνών συνδέσμων. Επίσης αλληλεπιδρά με το κολλαγόνο σχηματίζοντας έτσι υπερμοριακά συσσωματώματα. Μέσω αυτών των αλληλεπιδράσεων δημιουργούνται δίκτυα πηκτώματος-ινών (gel-fiber). Συμπερασματικά, το HA μπορεί να βρίσκεται ελεύθερο, συνδεδεμένο με τις υαλουρονοπροσκολλητίνες ή να αποτελεί μέρος πολύπλοκων δομών όπως αυτή που περιγράφηκε.

Το μόριο του HA παρουσιάζει σημαντικές υγροσκοπικές, ρεολογικές και ιξωδοελαστικές ιδιότητες οι οποίες ποικίλουν ανάλογα με τις αλλαγές της θερμοκρασίας, του pH, του ιονικού περιβάλλοντος και των παραγόντων που συνδέονται με αυτό. Επίσης οι ίδιες ιδιότητες εξαρτώνται από το μήκος της αλυσίδας του μορίου. Έχει την τάση να υιοθετεί μια ελικοειδή δομή όταν βρεθεί σε υδατικό διάλυμα. Τα ένυδρα διαλύματα του HA καταλαμβάνουν όγκο 1.000 φορές μεγαλύτερο σε σχέση με τα άνυδρα⁸⁹. Η δομή λοιπόν του HA σε συνδυασμό με το υψηλό ανιονικό φορτίο του, επιτρέπουν την κατακράτηση σημαντικής ποσότητας νερού, με αποτέλεσμα τον έλεγχο της ομοιόστασης του νερού και τη διατήρηση της ωσμωτικής πίεσης. Επίσης, λόγω της ρευστής μορφής και του υψηλού ιξώδους δρα ως λιπαντικό αλλά και ως απορροφητής κραδασμών. Μάλιστα θεωρείται ότι η επέκταση του πλέγματος της ECM κατά την ενυδάτωση του HA επιτρέπει στα κύτταρα να μεταναστεύουν σε περιοχές που διαφορετικά δε θα είχαν πρόσβαση. Το HA συμμετέχει σε διαδικασίες όπως είναι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η κινητικότητα, η καταστολή της κυτταρικής διαφοροποίησης, η σύνδεση των κυττάρων μεταξύ τους καθώς και με τον εξωκυττάριο χώρο, η μηχανική στήριξη των ιστών. Το HA είναι σημαντικός παράγοντας κατά την εμβρυογένεση, την αγγειογένεση, την επούλωση πληγών, την επιδιόρθωση και αναγέννηση ιστών. Όπως είναι φανερό υψηλά επίπεδα HA φυσιολογικά απαντώνται σε ιστούς, ωστόσο είναι δυνατόν να αυξηθούν σε παθολογικές καταστάσεις όπως σοκ, εγκαύματα, δημιουργία κακοήθους όγκου⁹⁰. Σχετικά με τη συμμετοχή

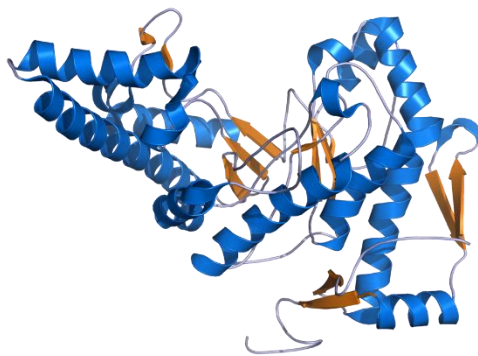
του HA στην καρκινογένεση, το ίδιο φαίνεται να εμπλέκεται στο μηχανισμό διήθησης των καρκινικών κυττάρων και στις μεταστάσεις. Μεγάλος αριθμός επιθηλιακών όγκων του συνδετικού ιστού είναι πλούσιοι σε HA όπως τα μεσοθηλιώματα, τα νεφροβλαστώματα και σε μικρότερο βαθμό οι όγκοι του μαστού. Ο μέσος όρος HA στον ορό ενός υγιούς ενήλικα είναι περίπου 30 μg/L, ενώ επίπεδα γύρω στα 250 μg/L υποδηλώνουν επιθετική ασθένεια, χωρίς όμως διαγνωστική αξία. Στους περισσότερους όγκους, παρατηρείται ιδιαίτερη αύξηση στην αναλογία του HA σε σχέση με τις άλλες γλυκοζαμινογλυκάνες. Τα επίπεδά του γύρω από τον όγκο συχνά σχετίζονται με την επιθετικότητα της νόσου και την κακή πρόγνωση του καρκίνου. Η αύξηση της ποσότητας του HA γύρω από τους καρκινικούς όγκους *in vivo* δεν προκύπτει εξ ολοκλήρου από αυξημένη σύνθεσή του. Είναι πιθανό ότι το HA, λόγω των φυσικοχημικών του ιδιοτήτων, δημιουργεί διαπερατά στρώματα μέσα στα οποία τα κύτταρα μπορούν εύκολα να αλλάξουν σχήμα και να μεταναστεύσουν. Παρόλα αυτά η λειτουργικότητα της συσσώρευσης του HA σε καρκινικούς ιστούς παραμένει ανεξήγητη⁹¹⁻⁹². Επίσης υψηλά επίπεδα HA είναι δυνατόν να βρεθούν σε ηπατική κίρρωση (>46.5 ng/mL), σε ρευματοειδή αρθρίτιδα (0.07-6.4 μg/mL), στην αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα (7-13 μg/mL), και στην οστεοαρθρίτιδα (0.04-2.3 μg/mL). Μάλιστα η υψηλή συγκέντρωση HA στον ορό ασθενών με κίρρωση ήπατος χρησιμοποιείται σαν στοιχείο διαγνωστικής μεθόδου⁹³. Τα oligομερή του HA αυξάνουν την μετανάστευση των κυττάρων και την έκφραση των γονιδίων της MMP-9 και της MMP-13 στα κύτταρα του καρκίνου των πνευμόνων του Lewis (3LL) και στους πρωτογενείς εμβρυϊκούς ινοβλάστες.

Το μοριακό βάρος του HA μπορεί να φτάσει τα 10^7 Da (υψηλού μοριακού βάρους HA, HMWHA) ενώ μπορεί να υπάρξει και σε πολλές μικρότερες μορφές (χαμηλού μοριακού βάρους HA, LMWHA). Οι βιολογικές λειτουργίες που εκτελεί το HA εξαρτώνται από το μήκος της αλυσίδας του, το μοριακό του βάρος και τις συνθήκες κάτω από τις οποίες παράγεται. Οι υψηλού και χαμηλού μοριακού βάρους μορφές HA επιδεικνύουν αντίθετες επιδράσεις στην συμπεριφορά του κυττάρου. Εξωκυττάριο υψηλού μοριακού βάρους HA (HMWHA) αναστέλλει την ανάπτυξη του ενδοθηλιακού κυττάρου και κατά συνέπεια παρουσιάζει αντι-αγγειογενετικές ιδιότητες. Τα HMWHA πολυμερή έχουν μια αυξημένη ικανότητα να συνδέονται με το ινωδογόνο, μία από τις πρώτες αντιδράσεις που συμβαίνουν κατά την πήξη και είναι κρίσιμο στάδιο κατά την επούλωση πληγών. Σε παθολογικές καταστάσεις, όπως απώλεια αίματος, εγκαυμάτων, σηψαιμίας και εκτεταμένου τραυματισμού το ποσό του υψηλού μοριακού βάρους πολυμερούς αυξάνεται για την επιδιόρθωση τραυματισμένων ιστών και την αναγέννησή τους. Τα ίδια

πολυμερή είναι αντιφλεγμονώδη και ανοσοκατασταλτικά. Στην κυκλοφορία του εμβρύου και στο αμνιακό υγρό υπάρχουν υψηλές συγκεντρώσεις ΗΜWHA, οι οποίες μπορεί να εξηγούν μέρος της ανοσοκαταστολής του αναπτυσσόμενου εβρύου. Το ΗΜWHA αναστέλλει τη δημιουργία ουλής στις πληγές εμβρύων, αντίθετα με τα προϊόντα αποικοδόμησης του HA τα οποία συνεισφέρουν στη δημιουργία ουλής. Επιπλέον, η παραγωγή του ΗΜWHA είναι αυξημένη σε περιοχές φλεγμονής και συχνά σχετίζονται με την προσκόλληση λευκοκυττάρων και τη μετανάστευση. Πολλές μελέτες στηρίζουν την οργάνωση του ΗΜWHA για την παραγωγή υπερκατασκευών με πολλαπλές δομές και λειτουργίες λόγω της σχέτισης του με συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Έχει παρατηρηθεί ότι τα περιφερικά μονοκύτταρα του αίματος ενεργοποιούνται μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τις αλυσίδες του ΗΜWHA αλλά αυτό επάγει την έκφραση των αυξητικών παραγόντων και των στοιχείων της μήτρας (matrix) παρά τους προ-φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές. Αυτό δείχνει έναν αντιφλεγμονώδη ρόλο του διασταυρούμενου ΗΜWHA. Τέλος, οι ΗΜW μορφές του HA φέρουν εγγενείς αντιγηραντικές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Τα ΗΜWHA εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό στους φυσιολογικούς υγιείς ιστούς. Τα τμήματα του χαμηλού μοριακού βάρους HA (LMWHA) αλληλεπιδρούν με μια διαφορετική ομάδα υποδοχέων οι οποίοι πυροδοτούν σηματοδοτικά μονοπάτια και σημαντικές αλλαγές της κυτταρικής συμπεριφοράς. Το LMWHA έχει δειχθεί ότι επάγει την αγγειογένεση σε πολλά πειραματικά μοντέλα. Επίσης το ίδιο ενισχύει τη σύνθεση κολλαγόνου τύπου I και VII, τα οποία είναι μόρια της ECM του ενδοθηλιακού κυττάρου αγγειογενετικού φαινοτύπου. Οι χαμηλού και ενδιάμεσου μοριακού βάρους ($2 \times 10^4 - 4.5 \times 10^5$) ολιγοσακχαρίτες HA είναι ισχυροί επαγωγείς των φλεγμονωδών κυτταροκινών και των μορίων προσκόλλησης. Οι LMW μορφές του HA φέρουν ανοσοδιεγερτικές ιδιότητες. Η παρουσία μορίων LMWHA αποτελεί εκδήλωση της αντίδρασης των ιστών κάτω από συνθήκες στρες ("σήματα κινδύνου"). Ακόμη και το μικρότερο κομμάτι, ένας τετρασακχαρίτης, παρουσιάζει αντι-αποπτωτικές λειτουργίες, καταστέλλει δηλαδή τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Τα πολύ μικρότερα κομμάτια εμφανίζουν το χαρακτηριστικό ότι ενισχύουν την ένταση αυτής της δράσης των μικρών έως μεσαίου μεγέθους κομματιών HA. Το HA φαίνεται να είναι ένα σύστημα πολυμερούς που αποτελεί πηγή πληροφοριών ανάλογα με το μέγεθος των θραυσμάτων του. Μια άλλη άποψη που κυριαρχεί είναι ότι τα στοιχεία της ECM όπου βρίσκονται τα κύτταρα, και το HA, δεν έχουν μόνο δομικό ρόλο αλλά και ρυθμιστικό. Αξίζει να σημειωθεί ότι υπάρχει ακόμη και εκδοκυττάριο HA του οποίου όμως ο ρόλος στη φλεγμονή και στην επούλωση πληγών δεν έχει γίνει σαφής. Έχουν γίνει

κάποιες παρατηρήσεις σχετικά με την παραγωγή του εντός του κυττάρου σε καταστάσεις στρες⁹⁴.

Για την ομαλή οργάνωση και λειτουργία των ιστών, μια ισορροπία ανάμεσα στη σύνθεση και την αποικοδόμηση του HA είναι απαραίτητη. Ο μετασχηματισμός του HA είναι σχετικά γρήγορος εν συγκρίσει με άλλα μόρια της ECM. Υψηλού μοριακού βάρους HA ιστού αποικοδομείται εξωκυττάρια από χημικά/μηχανικά μέσα ή μέσω ειδικών ενζύμων. Σε ένα άτομο βάρους 70 kg υπάρχουν 15 gr HA κατά μέσο όρο, εκ των οποίων τα 5 gr ανακυκλώνονται καθημερινά. Σε αυτό το καταβολικό μονοπάτι συμμετέχουν οι Hyal-1 και -2, ο υποδοχέας HA της κυτταρικής επιφάνειας CD44 και δύο λυσοσωμικά ένζυμα, μια β-γλυκουρονιδάση και μια β-N-ακέτυλο-γλυκοζαμινιδάση. Μη ενζυμικά, το HA αποικοδομείται από δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) όπως είναι η ρίζα του υπεροξειδικού ανιόντος (O_2^-), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και ειδικότερα από ρίζες -OH που οδηγούν σε ποικίλα ενδιάμεσα τελικά προϊόντα κάτω από συνθήκες οξειδωσης. Αυτός ο τύπος αποικοδόμησης απαντάται σε γενικές γραμμές σε περιοχές που φλεγμαίνονται, σε τραυματισμένους ιστούς και σε καρκινογένεση. Οι ROS αποικοδομούν το HA τυχαία στις εσωτερικές γλυκοσιδικές συνδέσεις ενώ οι υαλουρονιδάσες που αναλύονται παρακάτω είναι ενδογλυκοσαμινιδάσες. Έχει διαπιστωθεί ότι τα προϊόντα ενζυμικού καταβολισμού του HA απαντώνται σε ευρεία κλίμακα μεγεθών, εξαρτώνται από τις δραστηριότητες κάθε υαλουρονιδάσης κάτω από παθολογικές συνθήκες και επιδεικνύουν διαφορετικές βιολογικές επιδράσεις.

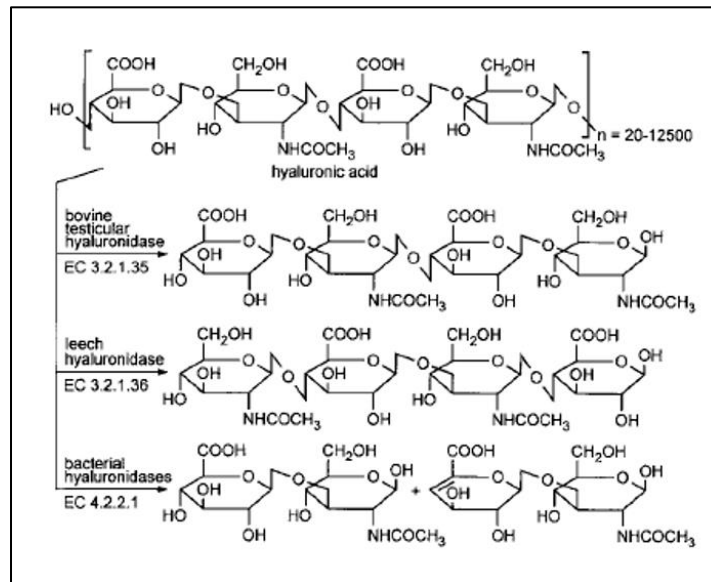


Εικόνα 40. Υαλουρονιδάση (Hyal)

Η υαλουρονιδάση (Hyal) είναι ένα όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει μια ομάδα αρκετά ανόμοιων ενζύμων από διαφορετικές πηγές τα οποία είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση του αναβολισμού και καταβολισμού του HA⁸⁸. Αυτά καταλύουν τον αποπολυμερισμό

του HA. Η άποψη ότι αυτές οι ενδογλυκοσιδάσες επιδεικνύουν έναν κοινό καταλυτικό μηχανισμό είναι ξεπερασμένη και εσφαλμένη. Κάποια από αυτά τα ένζυμα έχουν τη δυνατότητα να διασπούν και άλλες γλυκοζαμινογλυκάνες, αλλά με πιο αργό ρυθμό. Οι περισσότερες από τις υαλουρονιδάσες των ευκαρυωτικών κυττάρων φέρουν δράση υδρολυτική και trans-γλυκοσιδάσης, ενώ αυτές που προέρχονται από βακτήρια λειτουργούν μέσω β-απομάκρυνσης. Οι Hyals λοιπόν κατηγοριοποιούνται σε τρεις ομάδες με βάση τις καταλυτικές αντιδράσεις που προκαλούν ως εξής : (1) 4-γλυκανοϋδρολάση του υαλουρονικού (υαλουρονογλυκοζαμινιδάση, EC 3.2.1.35) η οποία είναι ενδο-β-N-ακετυλοεξοσαμινιδάση και υδρολύει σε τυχαίο σημείο το HA, (2) 3-γλυκανοϋδρολάση του υαλουρονικού (υαλουρονογλυκουρονιδάση, EC 3.2.1.36) η οποία είναι ενδο-β-D-γλυκουρονιδάση και διασπά τις συνδέσεις γλυκουρονικού του HA και (3) λυάση του υαλουρονικού (EC 4.2.2.1) (Εικόνα 41). Οι δύο υδρολάσες διασπούν ενδολυτικά τη β-1,4 και τη β-1,3 γλυκοσιδική σύνδεση του HA, αντίστοιχα, και δημιουργούν τους ανάλογους ολιγοσακχαρίτες ως κύρια τελικά προϊόντα – ζυγού αριθμού ολιγοσακχαρίτες (τετρα- και εξα-) με N-ακετυλογλυκοσαμίνη στο τελικό άκρο, η 4-γλυκανοϋδρολάση του υαλουρονικού και τετρασακχαρίτες και εξασακχαρίτες με γλυκουρονικό οξύ στο τελικό άκρο τους για την 3-γλυκανοϋδρολάση του υαλουρονικού - που αποτελούνται από απaráλλαχτες επαναλαμβανόμενες μονάδες δισακχαριτών. Η λυάση καταλύει μέσω της β-απομάκρυνσης την β-1,4 γλυκοσιδική σύνδεση του HA και οδηγεί στον σχηματισμό ακόρεστων Δ 4-5 ολιγοσακχαριτών (δισακχαριτών ή του τετρασακχαριτών), τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τα βακτήρια ως επιπλέον πηγή άνθρακα. Η διαφορά της λυάσης από τα άλλα δύο ένζυμα είναι ότι δεν χρησιμοποιεί υδρόλυση για τη δράση της. Μεγάλος αριθμός αυτών των ενζύμων έχει ταυτοποιηθεί από ποικίλες πηγές. Για παράδειγμα η 4-γλυκανοϋδρολάση του υαλουρονικού είναι παρούσα σε όρχεις, πλάσμα, ήπαρ και σε πολλούς ιστούς, καθώς επίσης στο δηλητήριο όφρων και μελισσών. Η 3-γλυκανοϋδρολάση του υαλουρονικού βρίσκεται στις βδέλλες και οι λυάσες του υαλουρονικού κατανέμονται ευρέως στα βακτήρια όπως *Streptococcus pneumoniae* (S. PHL) και *S. agalactiae* για αυτό και είναι γνωστές ως μικροβιακές υαλουρονιδάσες. Η αποδόμηση του HA στην ECM του ξενιστή προκαλεί την μείωση του ιξώδους και της ελαστικότητας του υποστρώματος οδηγώντας σε αυξημένη εξάπλωση των βακτηρίων και των τοξινών τους στο ξένο ιστό. Δραστηριότητα της υαλουρονιδάσης έχει γίνει αντιληπτή και σε άλλους μικροοργανισμούς όπως *Candida spp.* και *Malassezia pachydermatis*. Η υαλουρονιδάση που προέρχεται από τους βόειους όρχεις (BTH, bovine testes hyaluronidase) και αυτή που βρίσκεται στο δηλητήριο της μέλισσας (BVH, bee

venom hyaluronidase) είναι γνωστοί αντιπρόσωποι των αντίστοιχων ευκαρυωτικών ενζύμων, αν και πληροφορίες δομής υπάρχουν διαθέσιμες μόνο για την BVH. Επιπροσθέτως, οι υαλουρονιδάσες ελεύθερα κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες με βάση την τιμή pH από την οποία εξαρτάται η εκδήλωση της δράσης τους. Οι όξινες Hyals είναι δραστικές σε pH ανάμεσα στις τιμές 3 και 4, και αυτή η ομάδα περιλαμβάνει ανθρώπινες ηπατικές Hyals και Hyals του ορού. Οι ουδέτερες Hyals είναι ενεργές σε τιμές pH μεταξύ 5 και 8 και περιλαμβάνουν την PH-20, τις Hyals του δηλητηρίου όφεων και τις Hyals του δηλητηρίου της μέλισσας.



Εικόνα 41. Δομές υαλουρονικού οξέος και των κύριων τελικών προϊόντων διάσπασης από τις τρεις κατηγορίες υαλουρονιδάσης

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι υαλουρονιδάσες συχνά βρίσκονται σε όλους τους τύπους δηλητηρίων ζωικής προέλευσης. Η δραστηριότητά τους έχει ανιχνευθεί στο δηλητήριο όφεων, μελισσών, ψαριών, σκορπιών, αραχνοειδών, σαυρών, σφηκών. Σε όλα τα ζωικά δηλητήρια, η υαλουρονιδάση προκαλεί καταστροφή του τοπικού ιστού και γενικά αναφέρεται ως παράγοντας διάχυσης, όπως έχει γίνει σαφές και στην ενότητα του δηλητηρίου της παρούσας διατριβής. Η ικανότητα αυτή της διάχυσης είναι σημαντική καθώς κάνει δυνατή τη δίοδο των τοξινών από το σημείο του δήγματος/νυγμού στη συστηματική κυκλοφορία του θύματος. Αυτή η διαδικασία επιτυγχάνεται με την αποικοδόμηση του HA και την επακόλουθη απώλεια της συνέχειας της ECM των μαλακών συνδετικών ιστών που περιβάλλουν τα αιμοφόρα αγγεία, οδηγώντας έτσι στην εύκολη διάχυση των τοξικών παραγόντων του δηλητηρίου. Πολλές Hyals δηλητηρίων παρουσιάζουν ομολογία στην αλληλουχία τους κατά 36% με την ανθρώπινη PH-20. Αναστολή

της υαλουρονιδάσης σε περίπτωση δήγματος συνεπάγεται περιορισμό της λύσης του συνδετικού ιστού και της συνεπαγόμενης διάχυσης των τοξινών στη συστηματική κυκλοφορία⁸⁸

95 96

Στον ανθρώπινο οργανισμό, η υαλουρονιδάση βρίσκεται τόσο σε όργανα (όρχεις, σπλήνα, δέρμα, οφθαλμός, ήπαρ, νεφρό, μήτρα και πλακούντας), όσο και σε βιολογικά υγρά (υγρό δακρύων, αίμα και σπέρμα). Τα έξι γονίδια που κωδικοποιούν τις ανθρώπινες υαλουρονιδάσες (Hyal1, Hyal -1, -2, -3, -4, RH-20/SPAM1 και Phyal1) έχουν κλωνοποιηθεί και παρουσιάζουν ομολογία ενώ τρεις από τις υαλουρονιδάσες έχουν εκφραστεί σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές αν και δεν είναι διαθέσιμες μεγαλύτερες ποσότητες αυτών προκειμένου να γίνει ο ενζυματικός χαρακτηρισμός και η απόδοση δομής λόγω δυσκολίας στην απομόνωση και στον καθαρισμό τους. Τα τρία γονίδια βρίσκονται στο χρωμόσωμα 3p21.3 και τα υπόλοιπα τρία στο χρωμόσωμα 7q31.3. Το ψευδογονίδιο Phyal1 μεταγράφεται αλλά δεν μεταφράζεται. Με εξαίρεση τη RH-20 όλες οι υπόλοιπες εκφράζονται ευρέως. Οι Hyal1 και Hyal2 είναι οι κυριότερες υαλουρονιδάσες που εκφράζονται στους ανθρώπινους σωματικούς στούς. Αντίθετα στο γονιδίωμα των μυών υπάρχουν επτά γονίδια υαλουρονιδάσης. Ακόμη σε αντίθεση με τα βακτηριακά ένζυμα, οι ανθρώπινες Hyal1, RH-20 (ουδέτερη Hyal), Hyal-1 (όξινη Hyal) και Hyal-2 είναι δυνατόν να υφίστανται σε ποικίλες ισομορφές. Η Hyal1 ήταν η πρώτη σωματική υαλουρονιδάση που απομονώθηκε και στη συνέχεια κλωνοποιήθηκε και εκφράστηκε. Είναι ενεργή σε όξινο pH (βέλτιστη τιμή 3.8). Είναι η μόνη που ανιχνεύεται στο πλάσμα και συνιστά μια μοναδική πολυπεπτιδική γλυκοπρωτεΐνη (57 kDa) η οποία ανιχνεύεται και σε μια ισομορφή (45 kDa) στα ούρα, που παράγεται από δύο ενδοπρωτεολυτικές διασπάσεις του αρχικού μορίου και σύνδεση των δύο τμημάτων με δισουλφιδικό δεσμό, αφού έχει απομακρυνθεί το πεπτιδιο 99 αμινοξέων. Η Hyal1 μπορεί να χρησιμοποιεί σαν υπόστρωμα HA οποιουδήποτε μεγέθους και να παράγει κυρίως τετρα- και εξασακχαρίτες. Το ορθόλογο γονίδιο μυός έχει επίσης κλωνοποιηθεί, εκφραστεί και παρουσιάζει ομολογία κατά 73% με το ανθρώπινο ένζυμο. Υψηλά επίπεδα Hyal1 έχουν βρεθεί σε παρεγχυματικά όργανα όπως το ήπαρ, οι νεφροί, ο σπλήνας και η καρδιά. Η Hyal2 είναι επίσης δραστική σε όξινο pH (βέλτιστο pH 4), βρίσκεται προσδεσμένη στην κυτταρική μεμβράνη, ενώ με ενδοπρωτεολυτική διάσπαση μπορεί να υπάρξει στη διαλυτή της μορφή. Το ένζυμο αυτό μπορεί να διασπά μεγάλο μοριακού μεγέθους HA σε τμήματα 50 μονάδων δισακχαρίτη μοριακής μάζας 20 kDa περίπου. Οι Hyal1 και Hyal2 έχουν παρόμοιες δομές αλλά παράγουν διαφορετικά προϊόντα αντιδράσεων. Η Hyal2 θεωρείται ως η πιο

σημαντική ανάμεσα στις 2. Αποτελεί λυσοσωμικό ένζυμο και εκφράζεται σε πολλούς ιστούς, πλην του εγκεφάλου ενηλίκων όπου το γονίδιο της καταστέλλεται από προκαλούμενη μεθυλίωση αμέσως μετά τη γέννηση. Η Hyal3 παρότι εκφράζεται ευρέως δεν έχει γίνει ακόμη δυνατή η αναγνώριση της δραστικότητάς της με τις υπάρχουσες διαθέσιμες μεθόδους. Υφίσταται στα χονδροκύτταρα, στους όρχεις και στο μυελό των οστών και η έκφρασή της αυξάνεται όταν οι ινοβλάστες υπόκεινται σε διαφοροποίηση χονδροκυττάρων. Οι Hyal3 και Hyal2 υπερεκφράζονται από τις κυτταροκίνες όπως είναι η IL-1 και ο TNF-α ενώ η Hyal1 όχι. Η Hyal4 βρίσκεται και αυτή συνδεδεμένη πάνω στην πλασματική μεμβράνη. Σε αντίθεση με τις Hyal1 και PH-20 δεν έχει την ικανότητα να διασπά το HA. Είναι μια χονδροϊτινάση που παρουσιάζει απόλυτη εξειδίκευση ως προς τη χονδροϊτίνη και τη θειική χονδροϊτίνη. Η ανθρώπινη PH-20 ή SPAM1 (sperm adhesion molecule 1) είναι συνδεδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη, από την οποία μπορεί να απελευθερωθεί πρωτεολυτικά και να δώσει τη διαλυτή της μορφή. Η συνδεδεμένη μορφή της PH-20 έχει ουδέτερο βέλτιστο pH δράσης. Η PH-20 είναι μία διπλολειτουργική και προσκολλητική συγχρόνως πρωτεΐνη. Εμφανίζεται σε δύο ισομορφές μοριακής μάζας 65 kDa και 53 kDa μέσω πρωτεολυτικής διάσπασης σε άγνωστο σημείο του μορίου της. Είναι ειδικό ένζυμο των όρχεων και παίζει ρόλο στη γονιμοποίηση του ωαρίου από τα σπερματοζωάρια, διευκολύνοντας τη διείσδυση του σπερματοζωαρίου στο ωάριο. Αρχικά θεωρούνταν ιστοειδική, ενώ με τη χρήση της PCR ανάλυσης η PH-20 είναι ανιχνεύσιμη στην επιδιδυμίδα, στο μαστό, στο ουρογεννητικό σύστημα της γυναίκας, στον προστάτη, στον πλακούντα, καθώς και σε μεγάλο αριθμό κακοηθειών.

Οι μικροβιακές υαλουρονιδάσες οι οποίες ανήκουν στην κατηγορία των λυασών μπορούν να αξιολογηθούν μέσω φασματοφωτομετρικών μεθόδων που ανιχνεύουν τη δημιουργία ενός ακόρεστου δεσμού κατά τη διάρκεια της ενζυματικής αποικοδόμησης του υποστρώματος. Από την άλλη παρατηρείται έλλειψη απλών και ευαίσθητων μεθόδων για την μελέτη των υδρολασών. Οι τεχνικές που επιτρέπουν την ποιοτική ανίχνευση της δράσης της υαλουρονιδάσης μπορούν να είναι φυσικοχημικές και βασίζονται κυρίως σε μετρήσεις μείωσης της θολρότητας ή του ιξώδους διαλύματος υαλουρονικού οξέος υπό την ενζυμική επίδραση. Οι μέθοδοι ποσοτικοποίησης της δράσης της υαλουρονιδάσης σε βιολογικά δείγματα μπορούν να είναι φωτομετρικές οι οποίες βασίζονται στη μέτρηση της απορρόφησης συμπλόκου που σχηματίζεται ανάμεσα στο υαλουρονικό που διασπάται και σε χρωμοφόρα αντιδραστήρια, χρωματογραφικές, μέσω τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ζώνης, φθορισμομετρικές, μέσω

ζυμογραφίας κ.ά⁹⁷. Ωστόσο όπως αναφέρθηκε πολλές από αυτές παρουσιάζουν προβλήματα ως προς την ευαισθησία, είναι χρονοβόρες και πολύπλοκες ή απαιτούν αντιδραστήρια υψηλής εκλεκτικότητας τα οποία δεν μπορούν να είναι διαθέσιμα σε πολλά εργαστήρια. Αυτό εξηγεί την καθυστερημένη και μέχρι πρότινος παραμελημένη εξήγηση της σημασίας και της δράσης αυτής της κατηγορίας ενζύμων⁹⁸. Καθώς οι 4-γλυκανοϋδρολάσες του υαλουρονικού (EC 3.2.1.35) απελευθερώνουν *N*-ακετυλογλυκοζαμίνη τελικά άκρα από το υαλουρονικό οξύ η φωτομετρική μέθοδος που αναπτύχθηκε με βάση την Morgan-Elson αντίδραση για τον προσδιορισμό των υδατανθράκων που φέρουν τελικά άκρα εξοζαμίνης, έχει συχνά εφαρμοστεί με επιτυχία για τη μελέτη αυτών των ενζύμων. Σε αυτήν την περίπτωση η δραστικότητα της υαλουρονιδάσης προσδιορίζεται με χρωματομετρικό προσδιορισμό των προϊόντων υδρόλυσης του υαλουρονικού οξέος (και της *trans*-γλυκοζυλίωσης) όπως π.χ. άρτιου-αριθμού ολιγοσακχαριτών με *N*-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνη στο τελικό άκρο, κατόπιν αντίδρασης με το χρωμοφόρο *p*-διμεθυλαμινοβενζαλδεΐδη.

6.4.2 Αναστολείς της υαλουρονιδάσης

Όπως αναλύθηκε παραπάνω, ο ρόλος κλειδί των υαλουρονιδασών έχει αναγνωριστεί σε έναν αριθμό φυσιολογικών και παθολογικών λειτουργιών. Τα ένζυμα αυτά φαίνεται να συμμετέχουν σε διαδικασίες όπως είναι η γονιμοποίηση, η εμβρυϊκή ανάπτυξη, η αγγειογένεση, η φλεγμονή, η εξέλιξη μιας νόσου, η επούλωση πληγών, η βακτηριακή παθογένεση, η διάχυση συστηματικών τοξινών και δηλητηρίων, η καρκινογένεση και η μετάσταση⁹⁹. Οι Hyals παρότι είναι παρούσες σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις αναλαμβάνουν υψηλές αλλά ασταθείς εξειδικευμένες δραστηριότητες. Είναι αρκετά δύσκολη η ανίχνευσή τους και απαιτεί ειδικές τεχνικές⁹⁸. Οι Hyals ρυθμίζουν την χρονική και τοπική κατανομή τμημάτων HA, σημείο κρίσιμο για τις προαναφερθείσες διαδικασίες. Συνεπώς η ανάπτυξη και ο χαρακτηρισμός αναστολέων υαλουρονιδάσης θα μπορούσαν να συνεισφέρουν σημαντικά στην αντικαρκινική, αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακή θεραπεία (μόνοι τους ή σε συνδυασμό με άλλα αντιβιοτικά ως θεραπεία βακτηρίων που φέρουν λυάσες του υαλουρονικού όπως π.χ. *Streptococcus pneumoniae* (Gram-θετικό ανθρωποπαθογόνο)), στη δημιουργία νέου τύπου αντισυλληπτικών και στην αντιμετώπιση δηλητηριάσεων από δήγματα ζώων και νυγμούς υμενόπτερων³¹. Γενικότερα, οι αναστολείς υαλουρονιδάσης που έχουν αναφερθεί ανήκουν σε διαφορετικές χημικές κατηγορίες όπως π.χ. πρωτεΐνες, γλυκοζαμινογλυκάνες, πολυσακχαρίτες,

αντιοξειδωτικές ουσίες, αντιφλεγμονώδεις ουσίες, φυσικής προέλευσης βιοδραστικά συστατικά (φλαβονοειδή, αλκαλοειδή) και συνθετικά οργανικά μόρια⁸⁸.

Ο Haas το 1946 παρατήρησε την ύπαρξη ενός αναστολέα υαλουρονιδάσης στον ορό. Σε έναν αριθμό μεταγενέστερων κλινικών μελετών αναφέρθηκαν τα αυξημένα επίπεδα του αναστολέα στον ορό ασθενών με καρκίνο, ηπατική νόσο και δερματολογικές διαταραχές. Με βάση αυτές τις μελέτες πραγματοποιήθηκε η παραλαβή σε καθαρή μορφή ενός υψηλού μοριακού βάρους (120 kDa), θερμοευαίσθητου, γλυκοπρωτεϊνικής φύσης αναστολέα υαλουρονιδάσης από τον ορό μυός. Η ανασταλτική δράση ήταν ευαίσθητη σε πρωτεάσες και εξαρτώμενη από μαγνήσιο ενώ παρουσίαζε τη μέγιστη αναστολή σε τιμές pH μεταξύ 6 και 8. Η ίδια ουσία ήταν ικανή να αναστέλλει την υαλουρονιδάση που προέρχεται από βόειους όρχεις, από το δηλητήριο όφεων και μελισσών αλλά δεν ήταν δραστική ενάντια στη λυάση του υαλουρονικού του βακτηρίου *Streptomyces*. Τα επίπεδα του αναστολέα στον ορό μυών αυξάνονταν μετά από ένεση CCl₄ ή IL-1, επαγωγείς της οξείας φάσης απόκρισης. Συνεπώς ασθενείς που έχουν υποστεί εγκαύματα ή θερμικό σοκ θα μπορούσαν να επωφεληθούν από τη χορήγηση ενός αναστολέα υαλουρονιδάσης. Αυτός ο αναστολέας έχει ταυτοποιηθεί εν μέρει και αποτελεί μέλος της οικογένειας των inter- α -αναστολέων (inhibitors), I α I, οι οποίοι ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των πρωτεασών του πλάσματος, τύπου Kunitz⁸⁸. Η ηπαρίνη, μια όξινη, μεθείο, γλυκοζαμινογλυκάνη, που φέρει α (1-4) γλυκοσιδική σύνδεση των δισακχαριτών της, αποτελεί έναν γνωστό και καλώς χαρακτηρισμένο αναστολέα υαλουρονιδάσης. Αναστέλλει την αποικοδόμηση του HA μέσω ενός μη ανταγωνιστικού μηχανισμού, γεγονός το οποίο δείχνει ότι η ηπαρίνη δε συνδέεται στην καταλυτική θέση του ενζύμου. Σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις είναι ικανή να αναστέλλει τις υαλουρονιδάσες δηλητηρίων πιο αποτελεσματικά από το ένζυμο βόειας προέλευσης. Αντιθέτως οι υαλουρονιδάσες των βδελλών και των βακτηρίων *Streptomyces* δεν είναι ευαίσθητες στην ηπαρίνη. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε πειράματα που έχουν γίνει η ηπαρίνη επιδεικνύει ανασταλτική δράση και επί της φωσφολιπάσης A₂ από το δηλητήριο διαφόρων όφεων μέσω σχηματισμού ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στην αρνητικά φορτισμένη γλυκοζαμινογλυκάνη και στα βασικά ένζυμα φωσφολιπάσης A₂. Όσον αφορά τις αντιοξειδωτικές ουσίες, το ασκορβικό οξύ έχει αναφερθεί ως αναστολέας της λυάσης του HA του *S. pneumoniae*. Έχει δειχθεί ότι ένα μόνο μόριο της βιταμίνης C χτυπά το ένζυμο στο ενεργό του κέντρο και προκαλεί περίπου 25 αντιδράσεις με επτά προϊόντα. Επιπλέον έχει γίνει αναφορά και για τη δράση δομικών αναλόγων του ασκορβικού οξέος ενάντια των υαλουρονιδασών βόειας

προέλευσης και του *S. hyalurolyticus*. Ανάμεσα στις ουσίες που ελέγχθηκαν το L-ασκορβικό οξύ και το D-ισοασκορβικό οξύ ανέστειλαν και τα δύο ένζυμα αν και έδειξαν ισχυρότερη δράση ενάντια στην λυάση του HA. Η υδροχλωρική γουανιδίνη, η L-αργινίνη, ο μεθυλεστέρας της νιτρο-L-αργινίνης και η ισοθειοκυανιούχος γουανιδίνη εμφανίζουν ανασταλτική δράση επί της λυάσης του HA σε δόσεις πολύ χαμηλές που δεν επιφέρουν δομικές αλλαγές του ενζύμου. Από τα φυσικά προϊόντα το αριστολοχικό οξύ μπορεί να εξουδετερώσει τις υαλουρονιδάσες που προέρχονται από όρχεις προβάτου και δηλητήριο φιδιού. Αντιθέτως η αιμαλίνη και η ρεσερπίνη εμφανίζουν ασθενέστερη δράση σε σχέση με το αριστολοχικό οξύ. Αυτό ανέστειλε εξ' ολοκλήρου τις υαλουρονιδάσες του δηλητηρίου της κόμπρας *Naja naja* μέσω μη ανταγωνιστικού μηχανισμού. Από μελέτες φάνηκε ότι το αριστολοχικό οξύ δε συνδέεται με την καταλυτική θέση αλλά αντιδρά με τις εκτεθιμένες μονάδες τυροσίνης και τρυπτοφάνης της υαλουρονιδάσης. Η ίδια ουσία εξουδετέρωσε την ενζυμικά επαγόμενη τοξικότητα της μυτοξίνης VRV-PL-VIII και το αιμορραγικό σύμπλοκο-I. Η αναστολή της αποικοδόμησης του HA από την υαλουρονιδάση στο ανθρώπινο δέρμα και σε τμήματα ιστών μυών από το αριστολοχικό οξύ υποστηρίζει την πιθανή *in vivo* συνεισφορά του ενάντια της τοξικότητας που προκαλείται μέσω της θραυσματοποίησης του HA από τις Hyals και της μετέπειτα διάχυσης των τοξινών στην κυκλοφορία. Πιο συγκεκριμένα το αριστολοχικό οξύ αύξησε το χρόνο επιβίωσης σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε μύες στους οποίους έγινε έγχυση δηλητηρίου κόμπρας. Μερικά αντιφλεγμονώδη φάρμακα στα οποία ανήκουν τα σαλικυλικά, η ινδομεθακίνη και ντεξαμεθαζόνη παρουσιάζουν ανασταλτική της υαλουρονιδάσης δράση. Αυτά τα φάρμακα πιθανόν αποτρέπουν την αποικοδόμηση του HA από τις υαλουρονιδάσες καθώς τα προϊόντα διάσπασης του HA είναι ισχυροί επαγωγείς των φλεγμονωδών κυτταροκινών.

Στα φυτικής προέλευσης βιοδραστικά προϊόντα που χρησιμοποιούνται για να παρεμποδίσουν τη δράση της υαλουρονιδάσης περιλαμβάνονται ακόμη φλαβονοειδή, ταννίνες, φυτικά αντιοξειδωτικά, κουρκουμίνες, κουμαρίνες, υδρανγενόλες, σесκιτερπενικές λακτόνες, γλυκυρριζίνη και αλκαλοειδή. Αυτά τα συστατικά έχουν χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά ως αντισυλληπτικά, για την ενίσχυση της επουλωτικής διαδικασίας, ως αντιφλεγμονώδη και για την αντιμετώπιση δήγματος όφεων, κυρίως μέσω της ικανότητάς τους να αναστέλλουν την υαλουρονιδάση στις αντίστοιχες καταστάσεις^{100 101}. Επίσης κάποια φυτικά εκχυλίσματα χρησιμοποιούνται στην παραδοσιακή θεραπευτική για τον ίδιο λόγο. Υδατικά, μεθανολικά ή αιθανολικά εκχυλίσματα έχουν παρασκευαστεί από διάφορα φυτικά είδη και μέρη αυτών

προκειμένου να ελεγχθεί η ικανότητά τους ως αναστολείς υαλουρονιδάσης. Μερικά από αυτά είναι τα εξής: ρίζα του *Mimosa pudica* (Fabaceae)⁵⁰, *Withania somnifera* (Solanaceae) με υπεύθυνο δραστικό συστατικό μια γλυκοπρωτεΐνη η οποία εμφανίζει αναστολή της υαλουρονιδάσης δηλητηρίου οφιοειδών αλλά και της φωφολιπάσης A₂ του δηλητηρίου της κόμπρας¹⁰², καρποί του *Rubus fruticosus* (Rosaceae) με υπεύθυνα βιοδραστικά συστατικά τις περιεχόμενες πολυφαινόλες¹⁰³, αιθανολικό εκχύλισμα από τα σπέρματα του *Tamarindus indica* (Leguminosae)³², υδατικό διάλυμα *Lythrum salicaria* (Lythraceae) το οποίο αποτελεί δρόγη της παραδοσιακής πολωνικής θεραπευτικής για την αντιμετώπιση φλεγμονωδών παθήσεων και είναι πλούσιο σε ελλαγιτανίνες¹⁰⁴, αιθανολικό εκχύλισμα φύλλων *Melissa officinalis* L. (Labiatae) με υπεύθυνο βιοδραστικό συστατικό το ροσμαρινικό οξύ¹⁰⁵ όπως επίσης και μεθανολικό εκχύλισμα ολόκληρου φυτού *Meehania urticifolia* (Labiatae) με υπεύθυνα συστατικά διμερή παράγωγα του ροσμαρινικού οξέος¹⁰⁶. Από την ίδια οικογένεια (Labiatae) φυτικά είδη που επίσης έχουν επιδείξει ικανοποιητική αναστολή της υαλουρονιδάσης είναι ο δυόσμος, το δεντρολίβανο, το φασκόμηλο, η ματζουράνα και το θυμάρι καθώς και είδη της οικογένειας Boraginaceae¹⁰⁵. Άλλα φυτικά εκχυλίσματα και προϊόντα που παρουσιάζουν ικανότητα αναστολής της υαλουρονιδάσης είναι το εκχύλισμα ακετόνης : νερού 80:20 υπέργειων τμημάτων του είδους *Lycopus lucidus* (Lamiaceae) (takuran) το οποίο χρησιμοποιείται παραδοσιακά για γυναικολογικά προβλήματα και καρδιαγγειακές παθήσεις σε Κίνα, Ιαπωνία και Κορέα με κύρια υπεύθυνα βιοδραστικά συστατικά από την κατηγορία των φαινυλοπροπανοειδών¹⁰⁷, το μεθανολικό εκχύλισμα από τα άνθη του είδους *Tagetes erecta* L. (Compositae) (Marigold) το οποίο παραδοσιακά χρησιμοποιείται σε δερματικές παθήσεις όπως π.χ. πληγές, εγκαύματα με υπεύθυνους δραστικούς δευτερογενείς μεταβολίτες το συριγγικό οξύ και τη β-αμυρίνη¹⁰⁸, το μεθανολικό εκχύλισμα κορμού του μαλαισιανού δέντρου *Payena dasyphylla* (Sapotaceae)¹⁰⁹, το εκχύλισμα αιθανόλης:νερού 80:20 *Areca catechu* (Arecaceae) το οποίο περιέχει βιοδραστικές πολυφαινόλες¹¹⁰, ο χυμός των καρπών του είδους *Cucumis sativus* (Cucurbitaceae) το οποίο παραδοσιακά χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση παθήσεων του δέρματος¹¹¹, οι τριτερπενικές σαπωνίνες και τα φαινολικά συστατικά του τσαγιού (*Camelia sinensis* (Theaceae))^{112 113}, γαλλικοί εστέρες και υδρολυόμενες ταννίνες¹¹⁴, μεθανολικό εκχύλισμα *Centella asiatica* (Ariaceae) με υπεύθυνο βιοδραστικό συστατικό τον ασιατικοσίδη, ένα γλυκοζυλιωμένο πεντακυκλικό τριτερπένιο, το υδατικό εκχύλισμα του είδους *Gymnema sylvestre* (Aporcynaceae)¹¹⁵, το μεθανολικό εκχύλισμα του φλοιού των καρπών του ινδικού είδους *Garcinia*

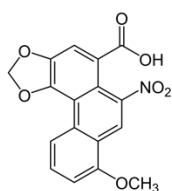
indica (Clusiaceae)¹¹⁶, το μεθανολικό εκχύλισμα του κορμού του είδους *Ficus microcarpa* (Moraceae) με υπεύθυνα βιοδραστικά συστατικά από την κατηγορία των φαινολικών¹¹⁷.



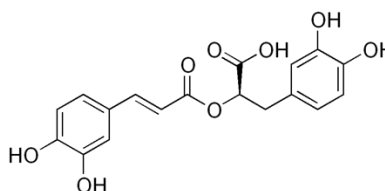
Εικόνα 42. Φυτικά είδη *Mimosa pudica*, *Withania somnifera*, *Rubus fruticosus*



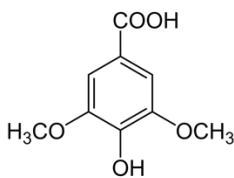
Εικόνα 43. Φυτικά είδη *Tamarindus indica*, *Melissa officinalis*, *Tagetes erecta*



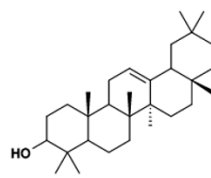
Αριστολοχικό οξύ I



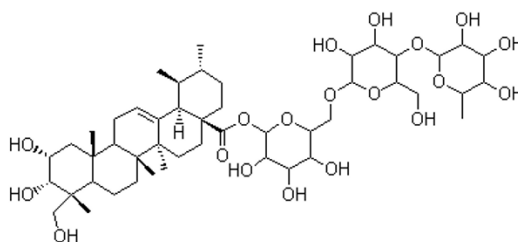
Ροσμαρινικό οξύ



Συριγγικό οξύ



β-αμυρίνη



Ασιατικοσίδης

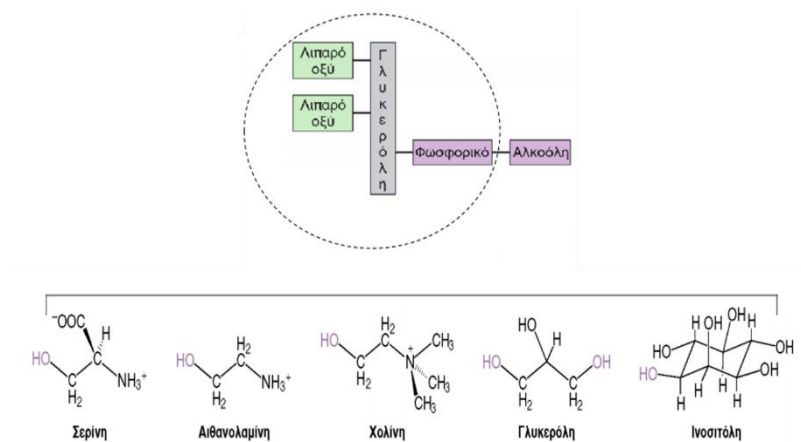
Εικόνα 44. Φυσικά προϊόντα που δρύν ως αναστολείς υαλουριδάσης

Τέλος παρακάτω αναλύονται κάποιες ακόμη θεραπευτικές εφαρμογές των αναστολέων της υαλουρονιδάσης. Πολλές αλλεργικές αντιδράσεις όπως είναι η αλλεργία στη γύρη και η γαστρεντερική αλλεργία, οι οποίες ανήκουν στις αντιδράσεις υπερευαισθησίας τύπου I, αποτελούν ένα σημαντικό πρόβλημα. Ο παθολογικός μηχανισμός πίσω από αυτές έχει αποδοθεί στην ενεργοποίηση των μαστοκυττάρων (σιτευτικών κυττάρων) και στην επακόλουθη απελευθέρωση χημικών ουσιών, ισταμίνης και λευκοτριενίων. Η υαλουρονιδάση (EC 3.2.1.35) έχει συσχετιστεί με την ενεργοποίηση των μαστοκυττάρων ενώ οι αναστολείς αυτής έχει δειχθεί ότι περιορίζουν τη διαδικασία. Επιπλέον το ένζυμο είναι γνωστό ότι εμπλέκεται στην αγγειακή διαπερατότητα και στη φλεγμονώδη διαδικασία. Η υαλουρονιδάση όπως έχει ήδη αναφερθεί εμπλέκεται στη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων. Ο μηχανισμός της μετανάστευσης αυτών εξαρτάται από τη διαρκή απελευθέρωση υαλουρονιδάσης η οποία παίζει συγκεκριμένο ρόλο στον αποπολυμερισμό της ECM, το φραγμό της εισβολής των καρκινικών κυττάρων. Προέκταση αυτού αποτελεί η θεώρηση ότι η εύρεση ενός τρόπου αναστολής της υαλουρονιδάσης καρκινικών κυττάρων θα μπορούσε όχι μόνο να αποτρέψει την κακοήγη εισβολή αλλά και να καθυστερήσει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον οι αναστολείς της υαλουρονιδάσης θα μπορούσαν να φανούν χρήσιμοι ως θεραπευτικοί παράγοντες κατά της αρθρίτιδας. Η ινώδης επούλωση ενηλίκων και καθυστερημένων χειρουργικών τραυμάτων συσχετίζεται με αυξημένη δραστηριότητα υαλουρονιδάσης και απομάκρυνση του υαλουρονικού οξέως¹¹⁸. Το HA είναι παρόν καθ'όλη τη διαδικασία της επούλωσης μιας πληγής. Δεν αποτελεί απλά ένα προϊόν της φλεγμονώδους απόκρισης, αλλά, ακόμη πιο σημαντικά, έναν παράγοντα ενίσχυσης της φλεγμονής και ολόκληρης της διαδικασίας της αποκατάστασης μιας πληγής. Συνιστά ένα 'φρουρό' ενάντια στην καταστροφή του ιστού μέσω των αλλαγών στο μέγεθος του πολυμερούς και καθοδηγεί εξίσου τις φλεγμονώδεις και επιδιορθωτικές διαδικασίες επούλωσης ενός τραύματος⁹⁴.

6.5 Φωσφολιπάση A₂

6.5.1 Γενικά

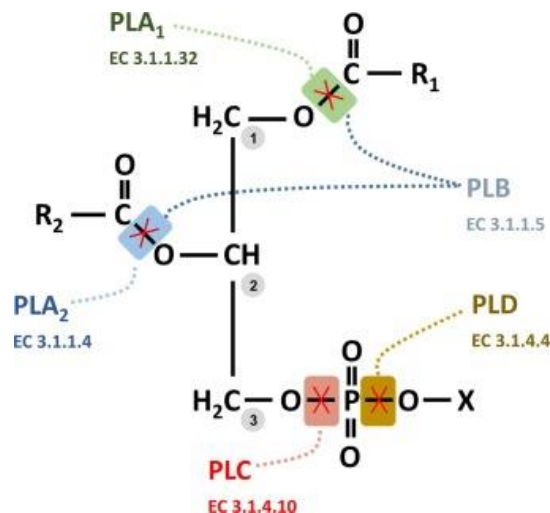
Φωσφολιπάση A (PLA)



Εικόνα 45. Δομή γλυκεροφωσφολιπιδίου

Τα φωσφολιπίδια είναι μόρια ευρέως διαδεδομένα στη φύση, αποτελούν την κύρια κατηγορία μεμβρανικών λιπιδίων (άλλα μεμβρανικά λιπίδια είναι τα γλυκολιπίδια και η χοληστερόλη) και διακρίνονται στα γλυκεροφωσφολιπίδια ή φωσφογλυκερίδια (λιπαρά οξέα που εστεροποιούνται με γλυκερόλη) και στα σφιγγολιπίδια (λιπαρά οξέα που εστεροποιούνται με σφιγγοσίνη). Λειτουργούν τόσο ως στοιχεία – κλειδιά των κυτταρικών μεμβρανών όσο και ως σημεία σύνδεσης για κυτταρικές και εξωκυτταρικές πρωτεΐνες. Επίσης οι μεταβολίτες τους δρουν ως δεύτεροι αγγελιοφόροι, εμπλεκόμενοι στον πολλαπλασιασμό και στην απόπτωση του κυττάρου. Τα γλυκεροφωσφολιπίδια συνιστούν παράγωγα της 3-φωσφορικής διακυλογλυκερόλης (*sn* – γλυκερο - 3-φωσφορικού οξέος) η οποία είναι εστεροποιημένη στις θέσεις του άνθρακα 1 (*sn*-1) και άνθρακα 2 (*sn*-2) με μη πολικά λιπαρά οξέα με αλυσίδες 14 έως 24 ατόμων άνθρακα, ενώ στην φωσφορική ομάδα του μορίου συνδέεται μια πολική μονάδα επικεφαλής (μια αζωτούχος βάση, μια γλυκερόλη, ή μια μονάδα ινοσιτόλης), X (Εικόνα 45). Τα φωσφολιπίδια αποτελούν πολύπλοκες δομές καθώς προκύπτουν ως αποτέλεσμα ποικίλων συνδυασμών πολικών ομάδων (υδρόφιλη κεφαλή) και λιπαρών ακυλο αλυσίδων (υδρόφοβη ουρά). Τυπικά, η *sn*-1 θέση των φωσφολιπιδίων δεσμεύεται από κορεσμένα λιπαρά οξέα, ενώ η *sn*-2 θέση δεσμεύεται από ακόρεστα λιπαρά οξέα.

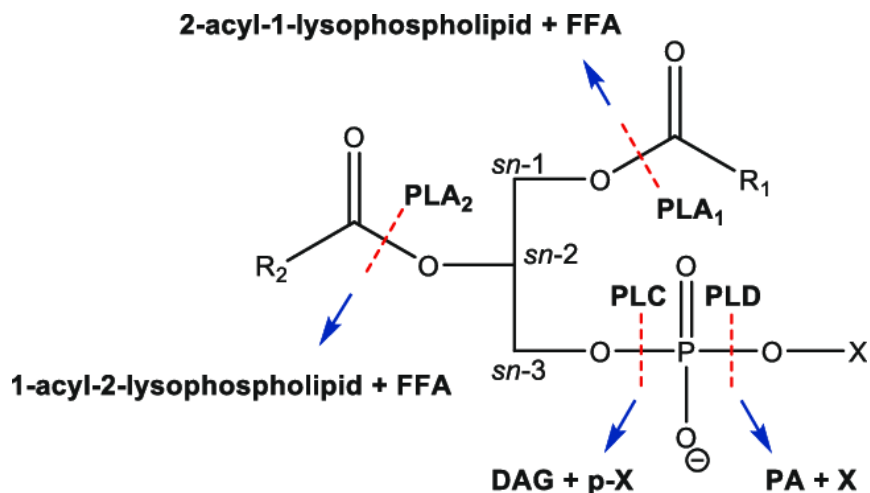
Λόγω του εύρους των μοναδικών χημικών τους δομών, τα φωσφολιπίδια είναι υπεύθυνα για ξεχωριστές λειτουργίες των βιολογικών συστημάτων. Τα λιπίδια παίζουν ουσιαστικό ρόλο στη δομή του κυττάρου και στην οργάνωσή του, στα σηματοδοτικά φαινόμενα, στη μεταφορά πληροφοριών και συστατικών, καθώς επίσης και στην ομαδοποίηση των μακρομορίων. Ταξινομούνται σε κατηγορίες βάσει του περιεχομένου της υδρόφιλης κεφαλής στη θέση $sn - 3$ του σκελετού της γλυκερόλης στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και στα ευβακτήρια ή στη θέση $sn - 1$ στα αρχαία. Οι κύριες κατηγορίες γλυκεροφωσφολιπιδίων που απαντώνται στις μεμβράνες των κυττάρων των θηλαστικών περιλαμβάνουν τις γλυκεροφωσφοχολίνες/φωσφατιδυλοχολίνες (PC), τις γλυκεροφωσφοαιθανολαμίνες/φωσφατιδυλοαιθανολαμίνες (PE), τις γλυκεροφωσφοϊνοσιτόλες/φωσφατιδυλοϊνοσιτόλες (PI), τις φωσφατιδυλογλυκερόλες/γλυκεροφωσφογλυκερόλες (PG) (καρδιολιπίνες (CL)) και τις γλυκεροφωσφοσερίνες/φωσφατιδυλοσερίνες (PS). Κάθε κύρια κατηγορία διαχωρίζεται περαιτέρω σε υποκατηγορίες με βάση τους $sn - 1$ και $sn - 2$ υποκαταστάτες στο σκελετό γλυκερόλης. Σε κάποιες περιπτώσεις τα λιπαρά οξέα, στην $sn - 1$ θέση, μπορούν να υποκαθίστανται από αιθερικές ή βινυλ(ο) - αιθερικές μονάδες [(πλασμανυλ) αιθερολιπίδια - πλασμαλογόνα (πλασμενυλ γλυκεροφωσφολιπίδια, αντιστοίχως)]. Τα πλασμαλογόνα αντιπροσωπεύουν το 30-35% των μεμβρανικών λιπιδίων του καρδιακού μυός. Στην περίπτωση των γλυκεροφωσφογλυκερολών και γλυκεροφωσφογλυκεροφωσφορικών, μια δεύτερη μονάδα γλυκερόλης συνιστά μέρος της υδρόφιλης κεφαλής, ενώ για τις γλυκεροφωσφογλυκεροφωσφογλυκερόλες (καρδιολιπίνες) μια τρίτη μονάδα γλυκερόλης τυπικά ακυλιώνεται (acylated) στις θέσεις $sn - 1'$ και $sn - 2'$ ¹¹⁹.



Εικόνα 46. Κατηγορίες φωσφολιπασών

Οι φωσφολιπάσες (PLs) συνιστούν μια μεγάλη, ποικιλόμορφη ομάδα ενζύμων τα οποία μεταξύ τους μοιράζονται την κοινή δράση της κατάλυσης της υδρόλυσης ενός κοινού υποστρώματος, των φωσφολιπιδίων. Τα ένζυμα αυτά διασπούν τα φωσφολιπίδια σε λιπαρά οξέα και άλλα λιπόφιλα παράγωγα. Ποικίλουν ως προς το σημείο της αντίδρασης πάνω στο μόριο φωσφολιπιδίου (κάθε ομάδα δρα σε διαφορετικό σημείο του φωσφογλυκεριδίου), τη λειτουργία και τον τρόπο δράσης τους, και τη ρύθμισή τους. Χωρίζονται σε τέσσερις κύριες κατηγορίες οι οποίες είναι οι A, B, C και D (Εικόνα 46). Οι φωσφολιπάσες A απαντώνται σε δύο μορφές, τις A₁ οι οποίες υδρολύουν καρβοξυλικούς εστέρες στη θέση sn - 1 και τις A₂ που δρουν στη θέση sn - 2 του σκελετού της γλυκερόλης. Η φωσφολιπάση B είναι δυνατόν να διασπά τον καρβοξυλικό εστέρα στην sn-1 ή sn-2 θέση, όπως έχει διατυπωθεί, και αποτελεί πιθανότατα ένα άλλο ένζυμο με προτιμώμενη ονομασία λυσοφωσφωλιπάση. Η φωσφολιπάση C (PLC) αποτελεί μια φωσφοδιεστεράση η οποία είναι υπεύθυνη για την υδρόλυση ενός γλυκεροφωσφορικού δεσμού ο οποίος συνδέει την πολική κεφαλή στον σκελετό γλυκερόλης και δρα πριν το άτομο του φωσφόρου. Τα προϊόντα της διάσπασης είναι η διακυλογλυκερόλη (DAG) και η τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP₃). Οι φωσφολιπάσες C παίζουν κεντρικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος, απελευθερώνοντας το δεύτερο αγγελιοφόρο της IP₃. Η φωσφολιπάση D (PLD) αποτελεί επίσης μια φωσφοδιεστεράση η οποία καταλύει την απομάκρυνση/υδρόλυση της υδρόφιλης κεφαλής (X), δρα μετά το άτομο του φωσφόρου στο σκελετό του υποστρώματος και απελευθερώνει φωσφατιδικό οξύ και μια αλκοόλη. Οι PLA, PLC και PLD είναι οι κύριες ομάδες μιας ακόμη πιο πολύπλοκης ταξινόμιας καθώς διαχωρίζονται σε επιμέρους υποομάδες. Μέχρι στιγμής 11 ισομορφές φωσφατιδυλοϊνοσιτολ-εκλεκτικών PLC κατηγοριοποιούνται σε 4

υποοικογένειες, PLC-beta, PLC-gamma, PLC-delta και PLC-epsilon. Αρκετές μορφές των PLD έχουν ανιχνευθεί σε κύτταρα θηλαστικών. Οι PLD-1 και PLD-2 είναι οι περισσότερο μελετημένες, αν και μια εκκριτική μορφή PLD καθώς και οι δράσεις λυσοφωσφολιπάσης D έχουν επίσης αναφερθεί¹²⁰.



Εικόνα 47. Φωσφολιπάσες: Μηχανισμοί αντίδρασης και προϊόντα διάσπασης γλυκεροφωσφολιπιδίων

Η ποικιλία των δράσεων των PLs και οι βιολογικοί ρόλοι πιθανόν κάνουν ασαφή πολλά ενωτικά θέματα. Αρχικά όλες οι PLs είναι εστεράσες. Ίσως πιο σημαντικό ακόμη, οι PLs διακρίνονται από τις γενικότερες εστεράσες. Παρόλο που οι ενζυμικές δράσεις και οι κινητικές των γενικότερων εστερασών συμβαίνουν σε διαλύματα, οι PLs λειτουργούν σε μια υδρολιπιδική διεπιφάνεια των ενζύμων με συγκεντρωμένα λιπίδια. Συνεπώς οι εστεράσες επιδεικνύουν κλασικές κινητικές Michaelis-Menten με διαλυτά υποστρώματα ενώ οι PLs όχι. Η ποικιλία των μηχανισμών δράσης αποδεικνύει ότι οι φωσφολιπάσες αποτελούν μόρια σημαντικά για τις επιστήμες ζωής καθώς η συνεχής αναδιαμόρφωση των κυτταρικών μεμβρανών περιλαμβάνει τη λειτουργία μίας ή περισσότερων φωσφολιπασών. Πέρα από το ρόλο που διαδραματίζουν στην ομοίωση των κυτταρικών μεμβρανών, εμπλέκονται στη διαδικασία της πέψης θρεπτικών ουσιών και στο σχηματισμό βιοδραστικών μορίων. Μάλιστα υπάρχουν ενδείξεις ότι κάποια από αυτά τα ένζυμα φέρουν μια βιολογική λειτουργία ανεξάρτητη της καταλυτικής δράσης η οποία σχετίζεται με τη σύνδεση τους σε ένα ρυθμιστικό υποδοχέα της μεμβράνης. Οι πρωτεΐνες που μοιάζουν στις φωσφολιπάσες αλλά φέρουν τοξικές ιδιότητες, στερούνται λειτουργικού καταλυτικού κέντρου και απαντώνται στα δηλητήρια. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι οι περισσότερες, αλλά όχι όλες, οι φωσφολιπάσες που έχουν μελετηθεί λεπτομερώς είναι διαλυτές πρωτεΐνες. Η διαλυτή φύση των φωσφολιπασών υποδηλώνει ότι η αλληλεπίδραση

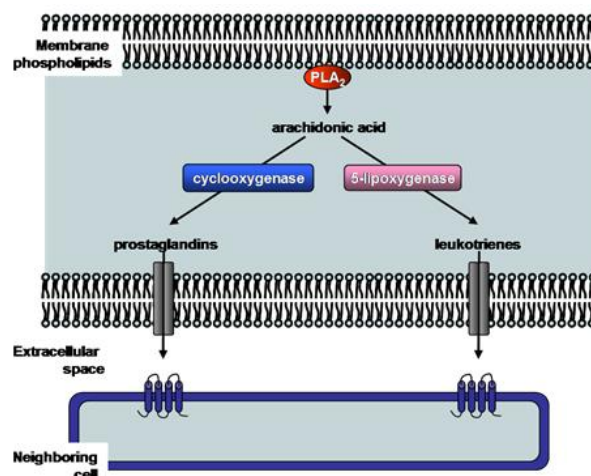
τους με τις κυτταρικές μεμβράνες συνιστά έναν από τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς οι οποίοι υπάρχουν για να αποτρέπουν τη μεμβρανική αποδόμηση. Οι υδρολυτικές δράσεις πολλών PLs είναι υπεύθυνες για την παραγωγή ποικίλων ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μορίων. Λόγω της απελευθέρωσης αραχιδονικού οξέος από τα κυτταρικά φωσφολιπίδια, κάποιες PLA₂s αποτελούν το αναγκαίο βήμα στη βιοσύνθεση των εικοσανοειδών. Φωσφατιδυλοϊνοσιτολ(ο)-εκλεκτική PLC δράση η οποία αποδίδει DAG και IP₃, ενεργοποιεί δύο ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια, την πρωτεϊνική κινάση C και την απελευθέρωση ιόντων ασβεστίου από τις ενδοκυτταρικές αποθήκες. Οι PLs είναι επίσης σημαντικές φαρμακολογικά καθώς μερικές από αυτές ενεργοποιούνται από ποικίλες αντιδράσεις υποδοχέα-προσδέματος συμπεριλαμβανομένων των 7 διαμεμβρανικών υποδοχέων. Ωστόσο οι περισσότερες PLs δρούν σε ένα ευρύ πεδίο βιολογικών ρόλων (π.χ. πέψη). Τα ένζυμα των φωσφολιπασών απαντώνται στις παγκρεατικές εκκρίσεις και στους ιστούς. Παίζουν ένα ρόλο στις τοξίνες και στα δηλητήρια ως προς την πέψη των μεμβρανών έτσι ώστε να επιτραπεί η εξάπλωση της μόλυνσης. Πέραν της πεπτικής λειτουργίας στους ανακυκλούμενους προδρόμους, έχουν ρόλους στη μεταγωγή σήματος. Οι φωσφολιπάσες A₁ και A₂ απομακρύνουν τις ακετυλο ομάδες για τη δημιουργία λυσοφωσφολιπιδίων. Αυτό αποτελεί το πρώτο βήμα στη διαμόρφωση των φωσφολιπιδίων όπου διαφορετικές ακετυλο ομάδες μπορούν να εστεροποιηθούν στους C1 και C2 για να παράγουν μια ποικιλία φωσφολιπιδίων. Οι φωσφολιπάσες A₂ απελευθερώνουν αραχιδονικό οξύ, ένα μόριο πρόδρομο της σύνθεσης προσταγλανδινών. Το αραχιδονικό και άλλα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα βρίσκονται πρωτίστως στην C2 θέση της γλυκερόλης φωσφολιπιδίων. Η φωσφολιπάση C ελευθερώνει δύο δραστικά ενδοκυτταρικά σήματα, την διακυλογλυκερόλη και την τριφωσφορική ινοσιτόλη, από την 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη. Η φωσφολιπάση D παράγει φωσφατιδικό οξύ από ποικίλα φωσφολιπίδια.

Φωσφολιπάση A₂ (PLA₂)

Οι PLAs όπως αναφέρθηκε παραπάνω χωρίζονται στις PLA₁ και PLA₂ βάσει της θέσης υδρόλυσης εντός των μορίων φωσφολιπιδίων. Το ένζυμο της PLA₂ υδρολύει τα φωσφολιπίδια στην sn – 2 θέση η οποία συνήθως περιέχει ακόρεστα λιπαρά οξέα όπως είναι το αραχιδονικό οξύ και οδηγεί στην απελευθέρωση αυτών των οξέων και λυσοφωσφολιπιδίων. Τα εικοσανοειδή είναι μια οικογένεια συστατικών τα οποία παράγονται από πολλούς κυτταρικούς τύπους (π.χ. μακροφάγα) μέσω του αραχιδονικού οξέος. Έχει υπάρξει αξιοσημείωτο φαρμακευτικό ενδιαφέρον ως προς τον χαρακτηρισμό των ενζύμων αυτής της κατηγορίας αναφορικά με το

ρόλο τους στην παραγωγή λιπιδικών διαμεσολαβητών στη φλεγμονή, όπως είναι το αραχιδονικό οξύ και τα εικοσανοειδή παράγωγά του, προσταγλανδίνες και λευκοτριένια. Έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 30 φωσφολιπάσες οι οποίες ανάλογα με τα κύρια χαρακτηριστικά τους, όπως το μοριακό βάρος, την αλληλουχία αμινοξέων ή την εξάρτηση της δράσης τους από την παρουσία ιόντων ασβεστίου ομαδοποιούνται σε 15 κατηγορίες (I – XV) της υπερικογένειας των PLA₂ με βάση τις αλληλουχίες αμινοξέων ενώ αυτές συναθροίζονται σε 5 βασικές κατηγορίες οι οποίες είναι οι εκκρινόμενες PLA₂s (sPLA₂s) με χαμηλό μοριακό βάρος, οι Ca²⁺ - εξαρτώμενες κυτοσολικές PLA₂s (cPLA₂s) με μεγαλύτερο μοριακό βάρος και δράση που εξαρτάται από τη συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου, οι Ca²⁺ - ανεξάρτητες κυτοσολικές PLA₂s (iPLA₂s) των οποίων η δραστηριότητα είναι ανεξάρτητη των ιόντων ασβεστίου, οι ακετυλοϋδρολάσες του PAF (PAF-AHs) και η λυσοσωμική PLA₂.¹²¹

Η κύρια λειτουργία συγκεκριμένων PLA₂ ενζύμων (π.χ. Ομάδα IV κυτοσολικής φωσφολιπάσης A₂) είναι η παραγωγή εικοσανοειδών (προσταγλανδινών και λευκοτριενίων). Η PLA₂ υδρολύει τα μεμβρανικά φωσφολιπίδια προς απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος. Η COX ή 5-LOX εν συνεχεία μετατρέπουν το αραχιδονικό οξύ είτε σε προσταγλανδίνες, θρομβοξάνια και προστακυκλίνες είτε σε λευκοτριένια και λιποξίνες αντιστοίχως (Εικ. 50). Αυτά τα μικρής διάρκειας ζωής μόρια μπορούν να εκρέουν, και εν συνεχεία να συνδέονται και να ενεργοποιούν συγκεκριμένους υποδοχείς γειτονικών κυττάρων προκειμένου να εκδηλωθεί η βιολογική δράση όπως είναι ο πόνος και η φλεγμονή.



Εικόνα 48. Παραγωγή εικοσανοειδών

Τα εικοσανοειδή συμμετέχουν σε πληθώρα φυσιολογικών λειτουργιών του κυττάρου αλλά και ολόκληρου του οργανισμού όπως η ρύθμιση της ροής του αίματος, η μετανάστευση, η έκκριση και η απόπτωση των κυττάρων. Η εμπλοκή των εικοσανοειδών στη δημιουργία φλεγμονής, τα καθιστά φαρμακολογικούς στόχους για την αντιμετώπιση παθολογικών καταστάσεων όπως ο καρκίνος, τα αυτοάνοσα νοσήματα και οι καρδιακές διαταραχές. Το δεύτερο προϊόν της δράσης της φωσφολιπάσης A₂, τα λυσοφωσφολιπίδια, συμμετέχουν στην σηματοδότηση των κυττάρων, στην αναδιαμόρφωση των φωσφολιπιδίων και στην ρευστότητα των μεμβανών¹²². Τα λυσοφωσφολιπίδια με κυρίαρχα το λυσοφωσφατιδικό οξύ (LPA) και τη λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (LysoPC) είναι αφενός βιοδραστικές ουσίες αφετέρου αποτελούν πρόδρομες ενώσεις του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF) ο οποίος εμπλέκεται ιδιαίτερα στην εκδήλωση φλεγμονής ενώ τα ίδια ενεργοποιούν τα λευκοκύτταρα του αίματος και μπορούν σε υψηλές συγκεντρώσεις να προκαλέσουν ιστικές βλάβες, γαστρικό έλκος, καρκινικό πολλαπλασιασμό και μεταστάσεις. Επομένως, τα ένζυμα αυτά αποτελούν ενδιαφέροντες φαρμακολογικούς στόχους για την ανακάλυψη νέων ισχυρών και εκλεκτικών αναστολέων φωσφολιπάσης A₂ για την καταπολέμηση ποικίλων σύγχρονων ασθενειών όπως νευρολογικές διαταραχές π.χ. σκλήρυνση κατά πλάκας, καρκίνος, ρευματοειδής αρθρίτιδα, φλεγμονή των πνευμόνων, καρδιαγγειακές παθήσεις, συμπεριλαμβανομένης της αθηροσκλήρωσης. Ορισμένοι από αυτούς έχουν εισέλθει σε κλινικές δοκιμές¹²³. Τέλος η φωσφολιπάση A₂ είναι ένα ένζυμο που περιέχεται στο δηλητήριο μελισσών και φιδιών, κυρίως στις οχιές, όπου συνιστά την πιο άφθονη κατηγορία πρωτεϊνών, και είναι τοξική καθώς επάγει ένα ευρύ φάσμα παθολογικών καταστάσεων όπως υπόταση, νευροτοξικότητα, μυοτοξικότητα, κυτταροτοξικότητα, οίδημα, καρδιοτοξικότητα και θρόμβωση (προ/αντι) και αναστολή του ενζύμου μπορεί να αποτρέψει την εκδήλωση αυτών.

Το πρώτο μέλος της οικογένειας των ανεξάρτητων ιόντων ασβεστίου φωσφολιπασών (iPLA₂), η GVIA ή iPLA₂β είναι ένα ένζυμο 85 – 90 kDa, το πλέον μελετημένο της οικογένειας, απαντάται καθολικά σε όλους τους ιστούς του σώματος και πιστεύεται ότι κατέχει κάποιο ρόλο στην ομοιοστατική ανακατανομή των φωσφολιπιδίων όπως και σε βασικές λειτουργίες του κυττάρου (πολλαπλασιασμός και απόπτωση). Η cPLA₂ είναι ένα κυτοσολικό ένζυμο βάρους 85 kDa με εξειδίκευση στα φωσφολιπιδικά υποστρώματα που περιέχουν το αραχιδονικό οξύ. Τα ένζυμα της Ca²⁺ - εξαρτώμενης κυτοσολικής φωσφολιπάσης A₂, γνωστά και ως Ομάδα IV φωσφολιπάσης A₂, περιέχουν μια Ca²⁺-εξαρτώμενη περιοχή σύνδεσης φωσφολιπιδίων και μια

καταλυτική α/β περιοχή υδρολάσης. Και οι δύο περιοχές είναι απαραίτητες για τη δράση της cPLA₂. Η περισσότερο χαρακτηρισμένη φωσφολιπάση A₂ της ομάδας IVA είναι η μόνη γνωστή PLA₂ με προτίμηση ως προς το αραχιδονικό οξύ στην sn – 2 θέση, συνεπώς αντιπροσωπεύει το κεντρικό ένζυμο το οποίο μεσολαβεί για τη δημιουργία των εικοσανοειδών. Πιθανόν ρυθμίζεται από τη συγκέντρωση του ενδοκυττάρου Ca²⁺, την κατάσταση φωσφορυλίωσής του και τη σύνδεση ποικίλων ενεργοποιητών. Η διαθεσιμότητα της πληροφορίας δομής της PLA₂ ομάδας IVA έχει επιτρέψει την ανάπτυξη αναστολέων. Δύο από τα πιο υποσχόμενα υποψήφια φάρμακα - αναστολείς, τα παράγωγα ινδολίου και οι 2 – οξοαμιδικοί αναστολείς, έχουν επιδείξει επιτυχή αποτελέσματα στη μείωση των φλεγμονωδών εκδηλώσεων σε *in vivo* πειράματα.¹²⁴

Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A₂ (sPLA₂)

Η πρώτη PLA₂ που ανακαλύφθηκε προήλθε από το δηλητήριο φιδιού, ενώ αργότερα ένζυμα PLA₂ βρέθηκαν και σε άλλους οργανισμούς συμπεριλαμβανομένων των θηλαστικών. Παρόλο που η μελέτη της χρήσης των δηλητηρίων ξεκίνησε από τα τέλη του 1890, το ένζυμο άρχισε να ερευνάται στις αρχές της δεκαετίας του 1940. Αξίζει να σημειωθεί ότι το αρχικό σύστημα αρίθμησης δημιουργήθηκε βάσει του είδους του φιδιού από το οποίο είχε απομονωθεί το ένζυμο. Η sPLA₂ περιλαμβάνει ένζυμα τα οποία μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ τους όπως το χαμηλό μοριακό βάρος (13 – 19 kDa), καταλυτική His (ιστιδίνη) – Asp (ασπαραγινικό οξύ) δυάδα, Ca²⁺ συνδεδεμένο στο ενεργό κέντρο (η δραστικότητα εξαρτάται από συγκέντρωση ασβεστίου) και 5 - 8 δισουλφιδικούς δεσμούς στο μόριο τους. Οι μοριακοί μηχανισμοί δράσης της εκκρινόμενης PLA₂ δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως. Σε πολλές μελέτες έχει εξεταστεί ο ρόλος που παίζει η εκκρινόμενη PLA₂ στην απελευθέρωση εικοσανοειδών, αλλά τα αποτελέσματα είναι ατελή.¹²⁵

Γενικά οι sPLA₂s δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερη εξειδίκευση ως προς τα λιπαρά οξέα που συνδέονται στα φωσφογλυκερίδια, οπότε δρουν το ίδιο αποτελεσματικά στα φωσφατιδυλογλυκερόλη, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη και φωσφατιδυλοσερίνη με μικρή προτίμηση προς την φωσφατιδυλοχολίνη. Υδρόφοβα αμινοξικά κατάλοιπα κοντά στο α – ελικοειδές N – τελικό άκρο των sPLA₂s υποστηρίζεται ότι συμβάλλουν στη διεπιφανειακή σύνδεσή τους με τα κυστίδια φωσφολιπιδίων ενώ η παρουσία τρυπτοφάνης στο κυστίδιο θεωρείται σημαντική για τη διεύθυνση του ενζύμου στο κυστίδιο.¹²⁵

Η υδρολυτική ικανότητα της sPLA₂ σε βιοδραστικά λιπίδια παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των κυτταρικών σημάτων. Όμως η ίδια δράση περιέχει και έναν παθολογικό ρόλο όπου η απελευθέρωση βιοενεργών λιπαρών οξέων και λυσοφωσφολιπιδίων οδηγεί τελικά σε μια σειρά προ-φλεγμονωδών αντιδράσεων. Οι sPLA₂s εκφράζονται και απελευθερώνονται στην κυκλοφορία από τα ανθρώπινα φλεγμονώδη κύτταρα, όπως είναι τα μακροφάγα, τα μονοκύτταρα, τα T κύτταρα κ. ά. Έτσι η sPLA₂ εμπλέκεται σε φλεγμονώδη και αυτοάνοσα νοσήματα, όπως επίσης και σε μεταβολικά π.χ. αθηροσκλήρωση, υπερλιπιδαιμία, διαβήτης και παχυσαρκία, ή ακόμη και σε φλεγμονώδη νοσήματα του δέρματος.

Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται 17 ομάδες εκκρινόμενων φωσφολιπασών οι οποίες διαφέρουν ως προς την πηγή προέλευσης, τη δομή και τη λειτουργία. Η sPLA₂ – IB θεωρείται βασικό ένζυμο της πέψης των λιπιδίων. Σε περίπτωση ταυτόχρονης αναστολής των φωσφολιπασών IB και X, μειώνονται οι πιθανότητες εμφάνισης κάποιου μεταβολικού νοσήματος, όπως η παχυσαρκία ή η αντίσταση στην ινσουλίνη. Η GX – sPLA₂ έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται στην παθολογία του άσθματος μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει την απελευθέρωση της λυσοPC ως την αρχή μιας αλυσιδωτής απελευθέρωσης φλεγμονωδών ενώσεων στους πνεύμονες. Οι εκκρινόμενες φωσφολιπάσες συμμετέχουν σε φλεγμονώδεις καταστάσεις όχι μόνο μέσω της υδρολυτικής τους ικανότητας αλλά και με τη δυνατότητα που έχουν να ενεργοποιούν την παραγωγή προ-φλεγμονωδών ενώσεων από τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα κ.ά. χωρίς να είναι απαραίτητη η ενζυμική δραστηριότητα π.χ. στην περίπτωση του άσθματος και της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας. Οι ομάδες GIB, GIIA, GV και GX των sPLA₂s επάγουν την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοκινών ανεξάρτητα από την υδρολυτική τους δραστηριότητα ενώ οι GIIA και GIII sPLA₂s παρουσιάζουν την ικανότητα της ρύθμισης διαφόρων μορίων στην επιφάνεια φλεγμονωδών κυττάρων. Φαίνεται ότι οι sPLA₂s εμπλέκονται σε παθολογικές καταστάσεις όπως το σύνδρομο αναπνευστικού στρες ενηλίκων (ARDS), η φλεγμονώδης πάθηση του εντέρου, η παγκρεατίτιδα ενώ παίζουν σημαντικό ρόλο στην υδρόλυση λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) και έτσι συνεισφέρουν στην εκδήλωση αθηροσκλήρωσης. Επίσης εμφανίζουν αντιπηκτική δράση. Ορισμένες sPLA₂s εμπλέκονται στην εξουδετέρωση Gram θετικών βακτηρίων και θα μπορούσαν να συμπεριληφθούν στις φαρμακοθεραπείες ενάντια στη βακτηριακή μόλυνση. Πιο συγκεκριμένα, η αντιμικροβιακή ικανότητα της ομάδας II sPLA₂ θεωρείται πλέον δεδομένη ως φυσιολογική λειτουργία του ενζύμου. Σε συνεργασία με άλλα αντιβακτηριακά πεπτίδια και πρωτεΐνες, η sPLA₂ προσδένεται

στις κυτταρικές μεμβράνες των Gram- θετικών ή αρνητικών βακτηριδίων και τα οδηγεί σε θάνατο μέσω της υδρόλυσης των φωσφολιπιδίων τους. Για το λόγο αυτό, η sPLA₂ μπορεί να θεωρηθεί ως μέρος του ανοσοποιητικού συστήματος του οργανισμού. Παρόλα αυτά, η ίδια ομάδα του ενζύμου έχει βρεθεί ότι υπερεκφράζεται σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως του προστάτη, του παγκρέατος, του μαστού και του παχέος εντέρου. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην ανάπτυξη λιπιδικών προ-φαρμάκων για την πιο στοχευμένη αποδέσμευση καρκινικών φαρμάκων, καθώς η υδρολυτική ικανότητα της sPLA₂ μπορεί να απελευθερώσει το φάρμακο στην επιθυμητή πάσχουσα περιοχή μειώνοντας έτσι την τοξικότητα αυτού στις υγιείς περιοχές. Επιπλέον η ίδια ομάδα, λόγω του ενδεχόμενου ρόλου της στις καρδιαγγειακές νόσους, μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο βιολογικό δείκτη ορού για αυτές τις νόσους. Εκτός της IIA, αντιμικροβιακή ικανότητα παρουσιάζει και η V – sPLA₂ όπως και αντιφλεγμονώδη με ιδιαίτερα προστατευτική δράση στην περίπτωση της αρθρίτιδας. Ακόμη μέσω πειραμάτων σε μύες, αποδείχθηκε ότι οι ομάδες III και X της εκκρινόμενης φωσφολιπάσης A₂ παίζουν σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση και την ενεργοποίηση του σπέρματος και συνεπώς στη γονιμότητα. Αυτό συμβαίνει διότι τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που εκκρίνονται από την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων είναι απαραίτητα για τις διεργασίες που περιλαμβάνονται στη δημιουργία του σπέρματος. Οι δράσεις αυτές, όπως και πληθώρα άλλων που ακόμα δεν έχουν βρεθεί υποστηρίζουν το γεγονός ότι κάποιες φωσφολιπάσες μπορεί να αποτελούν βιοενεργά και θεραπευτικά μόρια και δεν πρέπει να αναστέλλονται. Αντιθέτως σε κάποιες περιπτώσεις πρέπει να διεγείρεται η παραγωγή τους. Συνεπώς η έρευνα γύρω από αναστολείς εκκρινόμενων φωσφολιπασών A₂ θα πρέπει να εξειδικεύεται στη στόχευση μιας ισομορφής και σε ένα συγκεκριμένο ιστό προκειμένου να εκδηλωθεί το επιθυμητό θεραπευτικό αποτέλεσμα χωρίς ανεπιθύμητα αποτελέσματα σε υγιείς ιστούς¹²⁶.

Πίνακας 4. Ομάδες εκκρινόμενων φωσφολιπασών A₂ (sPLA₂)

Ομάδα	Πηγή απομόνωσης	Μοριακό βάρος (kDa)	Δισουλφιδικοί δεσμοί
IA	Κόμπρα/Βούγγαρος	13 – 15	7
IB	Πάγκρεας ανθρώπου / χοίρου	13 – 15	7
IIA	Κροταλίας / ανθρώπινο σάλιο	13 – 15	7
IIB	Δηλητήριο οχιάς	13 – 15	6
IIC	Όρχεις μυός / επίμυος	15	8

IID	Πάγκρεας / σπλήνα ανθρώπου / μυός	14 – 15	6
IIΕ	Εγκέφαλος / καρδιά / μήτρα ανθρώπου / μυός	14 – 15	8
IIF	Όρχεις / έμβρυο ανθρώπου / μυός	16 – 17	8
III	Άνθρωπος / μυς / σαύρα / μέλισσα	15 – 18 55 (άνθρωπος/μυς)	6
V	Καρδιά / πνεύμονες θηλαστικών / μακροφάγα	14	6
IX	Δηλητήριο σαλιγκαριού	14	6
X	Σπλήνα / θύμος αδένας / λευκοκύτταρα ανθρώπου	14	8
XIA	Εκβλαστήσεις πράσινου ρυζιού (PLA ₂ – I)	12.4	6
XIB	Εκβλαστήσεις πράσινου ρυζιού (PLA ₂ – II)	12.9	6
XII	Άνθρωπος / μυς	19	7
XIII	Μικροϊός DNA	<10	0
XIV	Συμβιωτικοί μύκητες / βακτήρια	13 - 19	2

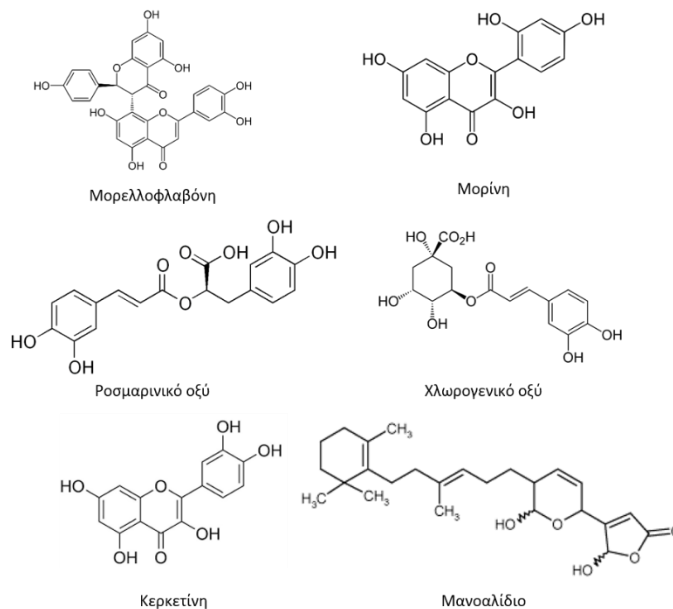
6.5.2 Αναστολείς της φωσφολιπάσης A₂

Πολλές είναι οι προσπάθειες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα για την ανάπτυξη εκλεκτικών PLA₂ αναστολέων ως πιθανών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων, χωρίς όμως ιδιαίτερη επιτυχία. Υπάρχουν τρία κριτήρια που πρέπει να πληρούνται από μια μελέτη που στοχεύει στην εύρεση νέων δραστικών PLA₂ αναστολέων και είναι τα εξής: 1) *in vitro* εκλεκτική αναστολή συγκεκριμένης ισομορφής του ενζύμου και ισχύς IC₅₀ ≤ 1μM για ενζυμικές και κυτταρικές δοκιμασίες, 2) *in vivo* αντιφλεγμονώδης δράση σε πειραματικά μοντέλα ζώων τα οποία είναι ευαίσθητα σε μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη (NSAIDs) και σε αναστολείς 5-LOX και 3) ικανότητα μείωσης πολλαπλών λιπιδικών ενδιάμεσων στις φλεγμονώδεις εκκρίσεις ή ιστούς ή επίδειξη *ex vivo* δράσης σε δείγμα αίματος σε παραπλήσιες φαρμακολογικές δόσεις. Τα προβλήματα καθιέρωσης PLA₂ αναστολέων εντοπίζονται συνήθως στην έλλειψη εκλεκτικότητας και στη δυσκολία καθορισμού της ισχύος της δράσης¹²⁷.

Περισσότερες από 40 κατηγορίες χημικών ενώσεων εμφανίζουν ικανότητα αναστολής της sPLA₂ και ενδεικτικά αναφέρονται οι εξής: φυσικά προϊόντα, ανάλογα του φυσικού

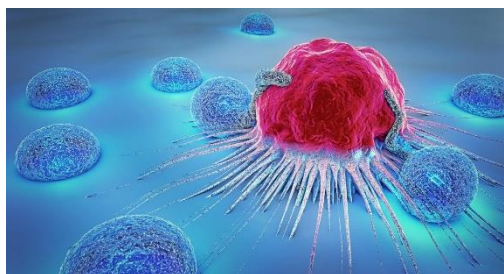
υποστρώματος π.χ. fluoroketones και phosphonates και συνθετικά παράγωγα ινδολίου όπως τα Me-Indoxam παράγωγα τα οποία φαίνεται να είναι από τους πιο δραστικούς sPLA₂ αναστολείς¹²⁶. Μερικά παραδείγματα από την ομάδα των φυσικών προϊόντων, που προέρχονται τόσο από φυτικούς όσο και από θαλάσσιους οργανισμούς, είναι οι ουσίες ακαλυφίνη (acalyphin), στιγμαστερόλη, χλωρογενικό οξύ, τεκτοριδίνη (tectordin), κουρκουμίνη, γκρασιλίνη A (gracilin A) και απλυσουλφουρίνη 1 (aplysulphurin 1) οι οποίες είναι ικανές να εξουδετερώσουν την εκκρινόμενη φωσφολιπάση δηλητηρίου οφιοειδών και εντόμων καθώς και τη βόεια παγκρεατική¹²⁸. Το θαλάσσιο φυσικό προϊόν μανσοαλίδιο που παραλαμβάνεται από το σπόγγο *Luffariella variabilis* αποτέλεσε τον πρώτο χαμηλού μοριακού βάρους παράγοντα που επέδειξε εκλεκτική αναστολή της PLA₂. Η αντιφλεγμονώδης δράση του περιγράφηκε το 1982, το σημείο που δρα επί του ενζύμου το 1983 ενώ το 1985 βρέθηκε τελικά ότι είναι μη αντιστρεπτός αναστολέας της sPLA₂¹²⁷. Η σκαλαραδιάλη (scalaradial) είναι ακόμη ένα θαλάσσιο απομονωμένο φυσικό προϊόν το οποίο αναστέλλει τη φωσφολιπάση δηλητηρίου οφιοειδών και μέλισσας¹²⁷. Το αριστολοχικό οξύ αποτελεί ένα μη ανταγωνιστικό αναστολέα της φωσφολιπάσης ο οποίος έχει δειχθεί ότι δημιουργεί ένα σύμπλοκο 1:1 με το ένζυμο. Ακόμη διάφορα φλαβονοειδή, αλκαλοειδή, σεσκιτερπένια κ.ά. έχουν μελετηθεί ως προς την ικανότητα αναστολής της φωσφολιπάσης. Η ουσία wedelolactone, που απομονώθηκε από το είδος *Eclipta prostrata* (Asteraceae), επέδειξε εξουδετέρωση των τοξικών επιδράσεων της PLA₂ που προέρχεται από δηλητήριο του *Calloselasma rhodostoma* και άλλων οργανισμών. Διτερπένιο που ανήκει στην κατηγορία νεο-κλεροδανίων και απομονώθηκε από το είδος *Baccharis trimera* (Asteraceae) εμφάνισε παρόμοια δράση. Πτεροκαρπάνες που φέρουν φαινύλιο ή βενζύλιο στο σκελετό τους εμφάνισαν δράση ενάντια στην μυστοξική PLA₂ και στην πρωτεολυτική δράση του δηλητηρίου φιδιού. Όπως έχει αναφερθεί και στο γενικό μέρος των φυτικών ειδών που δρουν ως αντιοφιοικοί παράγοντες, το εκχύλισμα των ριζών του είδους *Mimosa pudica* (Fabaceae), τα μεθανολικά εκχυλίσματα των ριζών των ειδών *Hemidesmus indicus* και *H. pluchea* (Aprocynaceae), το μεθανολικό εκχύλισμα του είδους *Eryngium creticum* (Ariaceae) παρουσιάζουν δράση ενάντια στη φωσφολιπάση. Το ροσμαρινικό οξύ, ένα πολυφαινολικό συστατικό ευρέως διαδεδομένο στις οικογένειες Boraginaceae και Lamiales, έχει δειχθεί ότι είναι ικανό να αναστείλει διάφορες PLA₂s δηλητηρίου οφιοειδών λειτουργώντας ως αντιφλεγμονώδες και αντι-μυστοξικό σε περίπτωση δηλητηρίασης^{47 129}. Το φλαβονοειδές μορελλοφλαβόνη (morelloflavone) είναι αναστολέας της sPLA₂¹³⁰ Ο δευτερογενής μεταβολίτης μορίνη έχει δειχθεί ότι μειώνει την ενζυμική δράση. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε με χρήση φωσφολιπάσης απομονωμένης

από το δηλητήριο του είδους *Crotalus durissus cascavella* η κερκετίνη προκάλεσε μείωση τη δράσης της και της πήξης του αίματος ενώ δεν επηρέασε τα συμπτώματα φλεγμονής και νευροτοξικότητας¹³¹. Γενικότερα όσον αφορά τα φλαβονοειδή, έχει αποδειχθεί ότι η παρουσία του υδροξυλίου στη θέση 5 στο δακτύλιο A, του διπλού δεσμού και του καρβονυλίου στο δακτύλιο C και των υδροξυλομάδων στις θέσεις 3' και 4' του δακτυλίου B επηρεάζουν την εκδήλωση της δράσης¹³².



Εικόνα 49. Φυσικά προϊόντα που δρουν ως αναστολείς φωσφολιπάσης

6.6 Καρκίνος



Εικόνα 50. Δημιουργία όγκου

Σύμφωνα με το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου των Ηνωμένων Πολιτειών (National Cancer Institute, NCI) ο όρος καρκίνος αφορά ένα σύνολο ασθενειών στις οποίες μη φυσιολογικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται δίχως έλεγχο και μπορούν να μεταναστεύουν σε διπλανούς ιστούς.

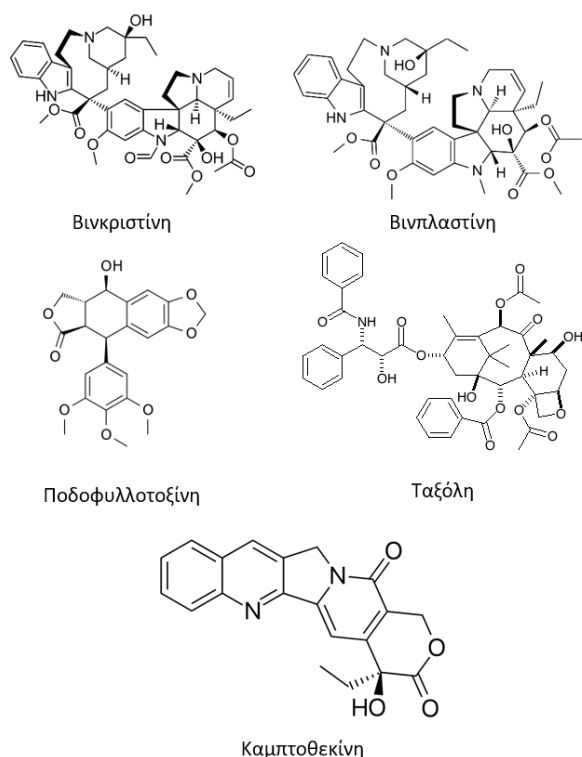
Ο καρκίνος μπορεί να εμφανιστεί σχεδόν σε οποιοδήποτε σημείο του σώματος και τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να εξαπλωθούν σε άλλα σημεία μέσω του αίματος και της λέμφου.

Υπάρχουν περισσότερες από 100 μορφές καρκίνου. Το καρκίνωμα είναι ένας καρκίνος που ξεκινά από το δέρμα ή από ιστούς που περιβάλλουν ή καλύπτουν εσωτερικά όργανα. Το σάρκωμα είναι ένας καρκίνος που ξεκινά από τα οστά, τους χόνδρους, το λίπος, τους μυς, τα αιμοφόρα αγγεία, ή άλλους συνδετικούς ή υποστηρικτικούς ιστούς. Η λευχαιμία είναι ένα τύπος που ξεκινά από τον αιμοποιητικό ιστό, όπως είναι ο μυελός των οστών, και προκαλεί την παραγωγή και είσοδο στην κυκλοφορία μεγάλου αριθμού μη φυσιολογικών κυττάρων αίματος. Το λέμφωμα και το πολλαπλούν μυέλωμα είναι τύποι που ξεκινούν από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι καρκίνοι του ΚΝΣ ξεκινούν από ιστούς του εγκεφάλου και το νωτιαίο μυελό. Ονομάζονται επίσης κακοήθειες. Οι βασικές διαφορές μεταξύ μιας καλοήθειας από μια κακοήθεια είναι ότι στην πρώτη περίπτωση ο όγκος εντοπίζεται σε ένα μόνο σημείο παρότι μπορεί να έχει μεγάλο μέγεθος ενώ στη δεύτερη περίπτωση ο όγκος μπορεί να εντοπιστεί πέρα από την αρχική εστία και σε πιο απομακρυσμένες περιοχές καθώς και ότι μετά την αφαίρεση μιας καλοήθειας δεν υπάρχει επανεμφάνιση όγκου ενώ μετά την αφαίρεση κακοήθειας ο όγκος επανεμφανίζεται κάποιες φορές. Η καλοήθεια στον εγκέφαλο είναι η μόνη απειλητική για τη ζωή περίπτωση.

Τα καρκινικά κύτταρα, σε αντίθεση με τα ειδικά φυσιολογικά κύτταρα, πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα χωρίς να υπακούουν σήματα και να υπόκεινται σε διαδικασίες όπως ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος και η απόπτωση τις οποίες χρησιμοποιεί ο οργανισμός για την απαλλαγή του από το πλεόνασμα κυττάρων. Επίσης τα καρκινικά κύτταρα είναι δυνατόν να επηρεάζουν τα γειτονικά υγιή κύτταρα, μόρια και αιμοφόρα αγγεία τα οποία περιβάλλουν και τροφοδοτούν έναν όγκο, περιοχή γνωστή ως μικροπεριβάλλον. Για παράδειγμα αναφέρεται ότι τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να ενεργοποιούν τα διπλανά φυσιολογικά κύτταρα προκειμένου να δημιουργήσουν αιμοφόρα αγγεία τα οποία τροφοδοτούν τον όγκο με οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά τα οποία χρειάζεται για την ανάπτυξή του ενώ απομακρύνουν τα άχρηστα προϊόντα. Τα καρκινικά κύτταρα είναι δυνατόν να μην υπόκεινται σε έλεγχο από το ανοσοποιητικό σύστημα το οποίο φυσιολογικά προστατεύει τον οργανισμό από μολύνσεις και παθολογικές καταστάσεις. Σε ειδικές περιπτώσεις μάλιστα χρησιμοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα προκειμένου να παραμείνουν ζωντανά και να αναπτυχθούν. Ο καρκίνος είναι μια γενετική ασθένεια η οποία προκαλείται από αλλαγές στο γονιδίωμα (μεταλλάξεις) με

αποτέλεσμα να επηρεάζεται ο τρόπος λειτουργίας των κυττάρων ιδιαίτερα όσον αφορά την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους.

Η ανάγκη ανάπτυξης νέων θεραπευτικών παραγόντων ενάντια στον καρκίνο είναι προφανής. Θεωρείται ότι το 60% των εγκεκριμένων αντικαρκινικών φαρμάκων προέρχονται από τη φύση, με τον ένα ή με τον άλλο τρόπο, με μεγάλη συνεισφορά από την πλευρά των εκχυλισμάτων φυτικών ειδών και των απομονωμένων δευτερογενών μεταβολιτών όπως π.χ. τα αλκαλοειδή βινκριστίνη και βινπλαστίνη τα οποία απομονώνονται από το είδος *Catharanthus roseus* (Aporcynaceae) και η ουσία επιποδοφυλλοτοξίνη (ισομερές της ποδοφυλλοτοξίνης) η οποία απομονώνεται από το είδος *Podophyllum peltatum* (Berberidaceae), ανήκει στην κατηγορία των λιγνανίων και τα παράγωγά της ετοποσίδης και τενιποσίδης χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση λεμφωμάτων και άλλων τύπων καρκίνου. Άλλο παράδειγμα είναι η ταξόλη που απαντάται στα είδη *Taxus brevifolia* και *Taxus baccata* (Taxaceae) και τα παράγωγά της χρησιμοποιούνται στη θεραπεία καρκίνου στήθους, ωθηκών και στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα. Η καμπτοθεκίνη που απομονώθηκε πρώτη φορά από το δέντρο *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae) αποτελεί ένα ακόμη παράδειγμα σπουδαίας ανακάλυψης καθώς τα παράγωγά της topotecan (καρκίνος των ωθηκών και μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα) και irinotecan (καρκίνος παχέος εντέρου) χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη¹³³.



Εικόνα 51. Φυσικά προϊόντα με αντικαρκινική δράση

Η εύρεση αντικαρκινικών φυσικών προϊόντων συνήθως προκύπτει μέσα από έλεγχο μεγάλου αριθμού εκχυλισμάτων τα οποία μπορεί να έχουν επιλεγεί τυχαία ή με ταξινομικά ή φυτοχημικά κριτήρια ή να είναι αποτέλεσμα εθνοβοτανικής αναζήτησης. Η εθνοφαρμακολογία αποτελεί έναν επιστημονικό κλάδο ικανό να προσφέρει νέα βιοδραστικά φυσικά προϊόντα στη φαρέτρα των ιατρών για την αντιμετώπιση διαφόρων μορφών καρκίνου σε μικρότερο χρόνο συγκριτικά με μια τυχαία επιλογή φυτικών ειδών καθώς προσφέρει τη δυνατότητα προήγησης της αναζήτησης των ήδη υπάρχοντων βιολογικών και φυτοχημικών μελετών για τα είδη στόχους¹³⁴. Η δυσκολία που εντοπίζεται σε μια τέτοιου είδους ερευνητική πορεία είναι ότι σε πολλές περιπτώσεις η έννοια καρκίνος δεν ορίζεται με σαφήνεια ή η αναφορά γίνεται σε καταστάσεις όπως σκληρά οιδήματα, κάλους, εξογκώματα, όγκους κ.ά.¹³³ Πιθανολογείται μάλιστα ότι στις περισσότερες περιπτώσεις πρόκειται κυρίως για καρκίνους που εντοπίζονται στο δέρμα, είναι απτοί, μπορούν να ψηλαφηθούν ή είναι εμφανείς με γυμνό οφθαλμό. Η υποστήριξη της αποτελεσματικότητας τρόπων θεραπείας του καρκίνου που πηγάζουν από τη λαϊκή θεραπευτική θα πρέπει να αντιμετωπίζεται με επιφύλαξη καθώς η διάγνωση της νόσου και η αποτελεσματικότητα της θεραπείας που εφαρμόζεται είναι δύσκολο να καθοριστούν εντός

ενός παραδοσιακού συστήματος ιατρικής σε αντίθεση με άλλες παθολογικές καταστάσεις οι οποίες είναι αρκετά πιο εύκολο να καθοριστούν όπως ο πόνος ή η ελονοσία. Ενδεικτικά αναφέρεται το παράδειγμα του Hartwell (1967-1971) ο οποίος δημιούργησε μια λίστα 3000 φυτικών ειδών τα οποία χρησιμοποιούνται παραδοσιακά ενάντια στον καρκίνο και περιέγραψε με λεπτομέρεια τις ενδείξεις του κάθε φυτικού μέρους¹³⁵.

Για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης θεωρήθηκε σκόπιμο να γίνει μια συνοπτική περιγραφή της έννοιας του καρκίνου και των τρόπων αντιμετώπισής του από τους Έλληνες ιατρούς σε όλο το φάσμα των ιστορικών περιόδων της θεραπευτικής.

Διάγνωση

Ο Ιπποκράτης (5^{ος} αιώνας π.Χ.) είναι ο πρώτος που περιγράφει τον καρκίνο του στήθους, έναν από το παλαιότερους καρκίνους, με τρόπο που παραπέμπει σε αυτό που σήμερα καλείται κακοήθεια σε αντίθεση με τον προγενέστερο Ηρόδοτο ο οποίος περιγράφει περίπτωση *φύματος*, πιθανόν καλοήθειας στήθους. Στο έργο *Corpus Hippocraticum* γίνεται αναφορά μιας τέτοιας περίπτωσης χωρίς όμως να παρουσιάζεται ο τρόπος αντιμετώπισης. Συγκεκριμένα μια γυναίκα που καταγόταν από τα Άβδηρα εμφάνισε όγκο στο στήθος (*καρκίνωμα*) ο οποίος συνοδευόταν από αιμορραγία από τις θηλές, κατάσταση η οποία δεν αντιμετωπίστηκε και η ίδια πέθανε.¹³⁶ Υπήρχε η θεωρία ότι ο καρκίνος (*καρκίνωμα*) προηγούνταν του όρου *καρκίνος κρυπτός*. Σταθερό δόγμα της αρχαιότητας το οποίο μάλιστα επικράτησε για χρόνια με μικρές παραλλαγές μέχρι την ελληνο-ρωμαϊκή περίοδο ήταν ότι όλοι οι όγκοι ήταν αποτέλεσμα φλεγμονής και μη φυσιολογικής συνάθροισης μικρότερων όγκων, στους οποίους η περίσσεια μέλαινας χολής ήταν σημαντική. Θεωρούσαν ότι η φύση των όγκων εξαρτιόταν από τα μείγματα των χυμών (αίμα, φλέγμα, κίτρινη και μέλαινα χολή) και από την απόκρισή τους σε ερεθίσματα όπως πυρετός, τραυματισμός, κάταγμα και καταπόνηση, με παρουσία σε συγκεκριμένο σημείο του σώματος. Ο όγκος εμφανιζόταν σε περιοχή εντοπισμένης φλεγμονής όταν ροή χυμών εντός των αγγείων προκαλούσε εξώθηση υγρού εκτός των φλεβών μέσα στη σάρκα και σε παρεγχυματικά συστατικά του σημείου του σώματος που έπασχε. Εν συνεχεία αυτό το εξωαγγειακό υγρό συσσωρευόταν και μπορούσε να *διαφθείρεται* σε ένα εξ' ολοκλήρου παρασκευασμένο μείγμα το οποίο είτε σταδιακά προσροφούνταν και δημιουργούσε ένα είδος κύστης είτε παρέμενε αόριστα ως όγκος ο οποίος είχε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Στην εποχή του Ιπποκράτη αλλά και μετέπειτα, εντοπίζονται οι εξής έννοιες:

- *Καρκίνος και καρκίνωμα*· μια ροή αίματος και μέλαινας χολής θεωρούνταν ότι προκαλούσε *σκίρρους*, ενώ η μέλαινα χολή που δεν είχε αναμειχθεί με το αίμα τους μετέτρεπε σε *καρκίνο*, ο οποίος κυρίως εντοπιζόταν στο γυναικείο στήθος. Το όνομα της νόσου προέρχεται από την ελληνική λέξη καβούρι λόγω της εντυπωσιακής ομοιότητας αυτού του σκληρού, σταθερού όγκου με το τραχύ, σκληρό περίβλημα ενός καβουριού και τις μακρυές προεκβολές του (πόδια και δαγκάνες), τα οποία του επιτρέπουν να παραμένει προσκολλημένο στο περιβάλλον.
- *Φύμα* · ένας γενικός όρος ο οποίος περιλαμβάνει πολλές μορφές όγκων που εμείς σήμερα θα χαρακτηρίζαμε ως καλοήθειες ή φλεγμονώδεις καταστάσεις. Κατ' αυτόν τον τρόπο περιγράφονταν κυρίως μικροί όγκοι του στήθους, οι οποίοι σχετιζόνταν με τη γαλακτόρροια που θα μπορούσε να αποτελεί κάποιο ινοαδένωμα.
- Άλλοι όροι όπως το *οίδημα* ήταν μαλακοί, μη ευαίσθητοι και άνευ άλγους όγκοι, οι οποίοι αφαιρούνταν με εφαρμογή πίεσης και πιθανώς περιελάμβαναν εμφανή οιδήματα του σώματος. Σε αντίθεση με τον καρκίνο ο οποίος προέκυπτε από το πλεόνασμα μέλαινας χολής, το οίδημα προκαλούνταν από το πλεόνασμα φλέγματος. Άλλες λέξεις που χρησιμοποιούνταν για να περιγράψουν νεοπλασίες ήταν ο *σκίρος* (σκληρό και άνευ άλγους οίδημα το οποίο μπορεί να δημιουργηθεί αυθόρμητα και συνήθως αναπτύσσεται σε περιοχή που φλεγμαίνει ή πηγάζει από ένα αρχικό οίδημα), *στρύμα* (σύμφωνα με το Γαληνό αποτελεί σκλήρυνση των λεμφαδένων), οι *μελικηρίδες* και τα *κονδυλώματα* (μολυσματικής προέλευσης ή κακοήθειες νεοπλασίες).

Οι αρχαίοι δεν φαίνεται να ξεχωρίζαν τις καλοήθειες από τις κακοήθειες αν και γνώριζαν την ικανότητα των όγκων με τους όρους καρκίνοι να διηθούν τους γειτονικούς ιστούς. Οι λέξεις *δεινά* και *κακοήθες* αφορούσαν δυσοίωνες αλλαγές της υπάρχουσας βλάβης, κάτι που υπαινίσσεται το μετασχηματισμό του όγκου.^{137 138 136}

Ο Γαληνός (2^{ος} αιώνας μ.Χ.) επιβεβαιώνει τις θεωρίες του Ιπποκράτη και των μεταγενέστερων συγγραφέων, υπογραμμίζοντας το γεγονός ότι συγκεκριμένοι καλοήθειες σκληροί όγκοι του στήθους, τους οποίους καλούσε *καρκίνους γενόμενους*, μπορούσαν να μετατραπούν σε καρκίνους. Περιγράφει τον καρκίνο του στήθους ως τον πιο συχνά απαντώμενο τύπο ο οποίος εμφανίζεται μετά την εμμηνόπαυση. Χρησιμοποιεί τον όρο *όγκος* για να περιγράψει οιδήματα, όλους τους τύπους καρκίνου και αλλοιώσεις. Αναλόγως με το μείγμα των χυμών που δημιουργούνταν στο σώμα του ασθενούς, ο τύπος της φλεγμονώδους απόκρισης

διέφερε π.χ. σε περίπτωση περίσσειας κίτρινης χολής αναπτυσσόταν *έρπης, ερυσίπελας* προκαλούνταν σε περίπτωση ιδιαιτέρως θερμής χολής, ο άνθρακας προέκυπτε από πυκνό καυτό αίμα και το οίδημα από περίσσεια φλέγματος¹³⁶.



Εικόνα 52. Ο Γαληνός (αριστερά) συζητά με τον Ιπποκράτη (δεξιά). Στην τοιχογραφία (Καθεδρικός Ναός Αναγνί, Ιταλία) δε λαμβάνεται υπόψη η διαφορά έξι αιώνων που χωρίζει τους δύο μεγάλους ιατρούς

Στη βυζαντινή θεραπευτική οι κακοήθεις όγκοι αναφέρονται ως *καρκινώματα, καρκινώδεις όγκοι, καρκινώδη και κακοήθη έλκη, καρκίνος, έλκωσις, αγριαινόμενα έλκη, υπερσαρκώματα, κακοήθεις μέλανες και φαγεδαινώματα* (καρκίνος δέρματος). Από την άλλη οι καλοήθεις όγκοι φέρονται ως *στεατώματα, αδενώματα, αθερώματα, σκιρρώματα, σκίρροι, σαρκώματα και σπίλοι*. Επικρατεί η θεωρία του Ιπποκράτη σχετικά με την αιτιολογία της νόσου ενώ αναγνωρίζεται η προδιάθεση του ατόμου. Ο Μυρεψός αναφέρει ότι ο καρκίνος εμφανίζεται λόγω "κακής διαθέσεως" του ατόμου ή λόγω "κακοχύμου παθήσεως των σπλάγχων". Ο Παύλος Αιγινήτης σημειώνει ότι ο καρκίνος "εκ μέλαινης χολής έχει την γένεσιν". Εμφανίζεται επίσης η αντίληψη της επίδρασης εξωτερικών επιβλαβών παραγόντων επί της δημιουργίας όγκων όπως υποδεικνύει η χρήση αντιδότων για την αντιμετώπιση αυτών. Χαρακτηριστική είναι η χρήση του πολύπλοκου μείγματος βοτάνων, της θηριακής, για τη θεραπεία του καρκίνου. Όπως συναίβει προγενέστερα έτσι και εδώ οι συχνότερες μορφές καρκίνου είναι αυτές του στήθους και της μήτρας ("καρκινωδέστατον" μαστόν και εις την μήτραν), κατά τους Νόννο, Νεόφυτο, Αέτιο, Ορειβάσιο και Παύλο Αιγινήτη, ενώ ακολουθούν οι καρκίνοι που εντοπίζονται εις τον "οφθαλμόν" και "περί έδραν η αιδοία". Η διάγνωση φαίνεται ότι επιτελούνταν με βάση τα χαρακτηριστικά του όγκου και τα συμπτώματα, ως σκληρίας και ρυπαράς ελκώσεως κατά τον Αέτιον, συνοδευόμενος από "σφοδρό" άλγος κατά τους Ορειβάσιο και Νόννο, "πονηράς καχεξίας" κατά το Νικόλαο Μυρεψό κ.τ.λ. Τα μέσα και οι μέθοδοι που εφάρμοζαν οι θεραπευτές της εποχής για τη διάγνωση περιελάμβαναν τη "διόπτρα" (το "κρυπτόν" καρκίνωμα της μήτρας

"δια της διόπτρας θεωρείται" υπό του Αετίου), την εξέταση ούρων και κοπράνων, την παρακέντηση του πλευριτικού υγρού θώρακος (ανευρίσκεται υπό του Αλεξάνδρου μέλαν υγρόν εκ "μελαγχολικού χυμού" προερχόμενον), την εξέταση των πτυέλων και του αίματος. Αξίζει να σημειωθεί ότι επιτελείται διαφορική διάγνωση των κακοήθων όγκων από τους καλοήθεις· κατά τον Αέτιο εκ των κλινικών σημείων, ως της σκληρίας ή της ρυπάνσεως του έλκους και κατά το Νεόφυτο εκ του θεραπευτικού κριτηρίου ήτοι της παροξύνσεως κατόπιν εφαρμογής θεραπευτικής αγωγής. Οι κακοήθειες διαχωρίζονται και από τις φλεγμονές, όπως αναφέρει ο Νεόφυτος χαρακτηριστικά "κατά την χροιάν μελάντεροι των φλεγμονών εισι, χωρίς θερμότητος τσαύτης". Σύμφωνα με τους Νόννο και Αέτιο ο καρκίνος είναι "δυσίατος ή ανίατος". Υπάρχουν ωστόσο περιπτώσεις κατά τους Νικόλαο Μυρεψό και Αέτιο όπου η νόσος δύναται να έχει ικανοποιητική ή πλήρη θεραπεία. Ο Νεόφυτος είχε τονίσει τη σημασία της πρόληψης και της έγκαιρης διάγνωσης προκειμένου να εξασφαλιστεί η καλή πρόγνωση της ασθένειας.

Θεραπεία

Ο Διοσκουρίδης (1^{ος} αιώνας μ.Χ.) στο *Περί Ιατρικής Ύλης* αναφέρει την πικραγγουριά (*Ecballium* sp.) και το γένος *Scrophularia* sp. ως είδη με δυνατότητα περιορισμού του όγκου. Ο όροβος και η χαμαιπίτυς χρησιμοποιούνταν εκλεκτικά για τα σκληρά εξογκώματα του στήθους ενώ η ασκληπιιάς εφαρμοζόταν σε κακοήθη έλκη του στήθους. Επίσης συνιστά το "ρόδιον έλαιον" ως λίαν ωφέλιμον επί των *κακοήθων ελκών* όπως και τον "ερέβινθον"¹³⁹.

Η θεραπεία του Γαληνού περιελάμβανε φλεβοτομία για την απαλλαγή του σώματος από το πλεόνασμα του χυμού της μέλαινας χολής. Υποστήριζε ακόμη τη θεωρία του Ιπποκράτη ότι στους καρκίνους που εντοπίζονται βαθειά δεν θα πρέπει να γίνεται παρέμβαση. Σε περίπτωση αφαίρεσης όγκου, ακολουθούσε χορήγηση κατάλληλης φαρμακοθεραπείας που εφαρμοζόταν στην πληγή και συστηματικά. Οι καρκίνοι που είχαν αναπτυχθεί στο θωρακικό τοίχωμα δε θα έπρεπε να αφαιρεθούν. Ο ίδιος παραθέτει μια εκτεταμένη λίστα αντικαρκινικών φαρμάκων προερχόμενων από φυτικούς, ζωικούς οργανισμούς κ.τ.λ.

Κατά την εποχή του Βυζαντίου η θεραπευτική προσέγγιση των διαφόρων τύπου καρκίνου ήταν χειρουργική και συντηρητική. Ο Αέτιος προχωρούσε σε αφαίρεση μόνο του κακοήθους όγκου ή μαστεκτομή σε περιπτώσεις που εντοπιζόταν καρκίνος του μαστού άνευ διηθήσεως. Ο Παύλος Αιγινήτης θεωρεί ότι ο καρκίνος "χειρουργούμενος χείρον διατίθεται" και

επιδεινούνται. Δινόταν μεγάλη σημασία κατά τη χειρουργική επέμβαση έτσι ώστε "μηδεμίαν απολείπεσθαι ρίζαν". Η συντηρητική αγωγή περιελάμβανε φλεβοτομία και κάθαρση, ειδική διαίτα, φυσιοθεραπεία και χρήση φαρμάκων. Η φλεβοτομία και η κάθαρση αποσκοπούν στην απαλλαγή του οργανισμού από το "μελαγχολικό χυμό". Ως καθαρτικά φάρμακα χρησιμοποιούνται το φυτό επίθυμον (λύκος) (*Cuscuta epithymum* (Convolvulaceae)) και ο μέλας ελλέβορος (*Helleborus niger* (Ranunculaceae)). Ιδιαιτέρως ο ελλεβορισμός αποτέλεσε ισχυρότατη μέθοδο αλλαγής της αντιδράσεως του οργανισμού κατά την οποία προκαλούνταν έμετοι, κενώσεις και άμετροι ιδρώτες. Όσον αφορά τη διαίτα, πρότειναν λήψη φρούτων, λαχανικών, πτηνών και ιχθύων και αποχή από το κρέας ενώ η φυσιοθεραπεία περιελάμβανε γυμνάσια, μαλλάξεις, αιώρα και εγκαθίσματα εντός ειδικών υγρών. Τα φάρμακα που χρησιμοποιούσαν ήταν εκκρίματα αδένων ζώων (π.χ. κάστορα), μέταλλα, χημικές, ζωικές και φυτικές ουσίες. Αυτά χορηγούνται υπό τη μορφή αντιδότην, δροσάτων ποτημάτων, ζουλαπίων, διαμασμένων σκευασιών, υπογλωσσίων δισκίων, χυλών, κηρωτών, αλειμμάτων, εμπλάστρων, σποδού (σκωρίας μετάλλων, τέφρας), εδρικών σκευασιών δι' εγχύσεως ή υποκλυσμού, κοκκίων, ξηρίων, πεσών, σμηγμάτων, ακόπων και κολλυρίων. Φάρμακα φυτικής προέλευσης αποτελούν τα παπάβερις λευκή, υοσκύαμος, κολοφωνία, μανδραγόρας, τερεβινθίνη, έλαιον μυροβάλανον, ίρινον, ρόδιον, λίβανος, ίρις ιλλυρική, σμύρνη, μαστίχη, αραβικό κόμμι, ναρδόσταχυς, ακάπνιος βοτάνη, μήκων μεγάλη, κόστος, στρύχνος, κασία, χαλβάνη, ίσατις, κισσός, κράμβη, ακαλήφη (κνίδη), η οποία "τα καρκινώδη...ιάται", ερείκη, ψύλλιον, αρνόγλωσσον, παλιούρος, επίθυμον, δρακόντιον (φιδόχορτον), το οποίο "καρκίνους...εκθήκειν πεπίστευται", χαμαιλέων μέλας (φυτόν καρδοπάθιον το κορυβανθές, χαμοληός, ιξία). Αντίδοτα αποτελούν η θηριακή, Μιθριδάτου, Ανδρομάχου και η "ιεράν Γαληνού" ^{140 141}.



Cuscuta epithymum



Helleborus niger



Paliurus spina-christi



Dracunculus vulgaris

Εικόνα 53. Φυτικά είδη που χρησιμοποιήθηκαν ως αντικαρκινικά από τους Έλληνες ιατρούς κατά την Αρχαιότητα και το Βυζάντιο

7 Υλικά-Μέθοδοι-Τεχνικές

7.1 Συμπύκνωση και ξήρανση δειγμάτων

Με σκοπό την απομάκρυνσης της υγρασίας από τα συλλεχθέντα φυτικά δείγματα και τα υδατικά εκχυλίσματα εφαρμόστηκε η τεχνική της λυοφιλοποίησης. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η συσκευή CHRIST ALPHA 1/5, η οποία αποτελείται από τα ακόλουθα τμήματα: i) ένα θάλαμο τοποθέτησης των δειγμάτων χωρητικότητας 50 L, ii) ένα θάλαμο συμπύκνωσης των υδρατμών, iii) μία αντλία υψηλού κενού και iv) ένα σύστημα ταχείας απόψυξης και απομάκρυνσης του νερού.

Στην περίπτωση των υπόλοιπων υγρών εκχυλισμάτων, χρησιμοποιήθηκε η συσκευή απόσταξης υπό κενό 'Rota Vapor' (σε θερμοκρασία 40 °C και κενό στα 50 περίπου mbar) ώστε να απομακρυνθεί ο διαλύτης και να παραληφθούν τα ξηρά εκχυλίσματα.

7.2 Τεχνικές Εκχύλισης

Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους (UAE)

Στην υποβοηθούμενη εκχύλιση με υπέρηχους (Ultrasound Assisted Extraction, UAE) το δοχείο που περιέχει το προς εκχύλιση δείγμα και τον επιλεγμένο διαλύτη τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε είναι η Elmasonic S 100 (H) η οποία χαρακτηρίζεται από ελάχιστη συχνότητα 16kHz διάδοσης των υπερήχων. Η εφαρμογή των υπερήχων έχει ως αποτέλεσμα την διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων μέσω του φαινομένου της 'σπηλαίωσης', ενώ με την αύξηση της θερμοκρασίας βελτιώνονται οι διαδικασίες διάχυσης και διαλυτοποίησης. Με βάση τα προαναφερόμενα γίνεται εύκολα κατανοητό ότι με την χρήση των υπερήχων μειώνεται ο χρόνος εκχύλισης και χρησιμοποιούνται μικρότερες ποσότητες διαλυτών για την επίτευξη του βέλτιστου αποτελέσματος.



Εικόνα 54. Συσκευή υπερήχων

Εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά

Η υπερκρίσιμη εκχύλιση (Supercritical Fluid Extraction, SFE) αποτελεί μία μέθοδο εκχύλισης στην οποία ως διαλυτικά μέσα χρησιμοποιούνται υπερκρίσιμα ρευστά ή ρευστά με υπερκρίσιμες ιδιότητες. Καθένα από τα προαναφερόμενα ρευστά διαθέτει μία κρίσιμη τιμή θερμοκρασίας (T_c), που είναι η θερμοκρασία πάνω από την οποία ο διαλύτης δεν μπορεί να υγροποιηθεί όσο και αν συμπιεστεί, αλλά και μια κρίσιμη πίεση (P_c), η οποία είναι η πίεση πάνω από την οποία δεν μπορεί να αεριοποιηθεί όσο και αν θερμανθεί. Ένας διαλύτης που βρίσκεται σε υπερκρίσιμες συνθήκες εμφανίζει χαμηλές τιμές του συντελεστή διάχυσης, του ιξώδους και της επιφανειακής τάσης, γεγονός που του προσδίδει πολύ καλές ρεολογικές ιδιότητες καθώς και πυκνότητα συγκρίσιμη με αυτή των υγρών, έχοντας ως αποτέλεσμα την αυξημένη διαλυτική του ικανότητα η οποία είναι συγκρίσιμη με αυτή του υγρού. Στα πειράματα της παρούσας διατριβής ως υπερκρίσιμος διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το CO_2 . Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου είναι η εξής: το CO_2 σε υπερκρίσιμες συνθήκες εισέρχεται στον εκχυλιστήρα, όπου έχει τοποθετηθεί η πρώτη ύλη ώστε να λάβει χώρα η εκχύλιση. Στη συνέχεια, το μείγμα εκχύλισης από την έξοδο του εκχυλιστήρα οδηγείται στο διαχωριστήρα, όπου με μια απλή εκτόνωση του συστήματος το CO_2 μεταπίπτει στην αέρια κατάσταση. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της διαλυτικής ικανότητας του CO_2 και την εναπόθεση των διαλυθέντων συστατικών στο εσωτερικό του διαχωριστήρα. Τέλος, ο διαλύτης απαλλαγμένος πλέον από τις ουσίες, τις οποίες είχε παραλάβει προηγουμένως από το εκχυλιζόμενο υλικό, ανακυκλώνεται στο σύστημα και η προαναφερόμενη διεργασία επαναλαμβάνεται μέχρις ότου ολοκληρωθεί η διαδικασία της εκχύλισης (Δυναμική εκχύλιση).

Πραγματοποιήθηκε υπερκρίσιμη εκχύλιση σε μικρή ποσότητα νωπής ρίζας του είδους *Paeonia parnassica* με χρήση της συσκευής SFE-500 (SEPAREx CHIMIE FINE, France), η οποία περιλαμβάνει εκχυλιστήρα χωρητικότητας 500 mL, εντός του οποίου τοποθετείται κυλινδρικό δοχείο εκχύλισης, το οποίο φέρει την πρώτη ύλη. Ο σχεδιασμός της συσκευής είναι τέτοιος που επιτρέπει την ταχεία φόρτωση και εκφόρτωση του προς εκχύλιση υλικού καθώς επίσης προσφέρει τη δυνατότητα προσθήκης συνδιαλύτη στο σύστημα (π.χ. αιθανόλη). Η συλλογή του εκχυλίσματος πραγματοποιείται σε τρία δοχεία διαχωρισμού (διαχωριστήρες) τα οποία είναι συνδεδεμένα σε σειρά. Έχουν χωρητικότητα 18 mL το καθένα και μπορούν να λειτουργούν υπό διαφορετικές συνθήκες. Κατ' αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η κλασμάτωση του εκχυλίσματος και η παραλαβή προϊόντων διαφορετικής σύστασης. Εσωτερικά τα δοχεία είναι σχεδιασμένα σαν κυκλώνες, ώστε το ρευστό να εισέρχεται εφαιπτομενικά ως προς τα τοιχώματα του θαλάμου και

να επιτυγχάνεται η κατακρήμνιση του εκχυλίσματος με τη μικρότερη δυνατή παράουση. Τα χαρακτηριστικά μεγέθη και οι συνθήκες λειτουργίας της συσκευής παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5).

Πίνακας 5. Χαρακτηριστικά μεγέθη και προδιαγραφές υπερκρίσιμης εκχύλισης SFE-500

Μέγιστη πίεση λειτουργίας	300 bar
Μέγιστη θερμοκρασία λειτουργίας	70 °C
Θερμοκρασιακό εύρος λειτουργίας του ψυκτικού	-25 °C έως 40 °C
Ροή διαλύτη	0.5-5 kg/h
Όγκος δοχείου εκχύλισης	400 mL
Όγκος κάθε δοχείου διαχωρισμού	18 mL
Υλικό κατασκευής	316L ανοξείδωτος χάλυβας, PTFE

7.3 Αναλυτική Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (Analytical TLC)

Με σκοπό το γρήγορο ποιοτικό έλεγχο των ολικών εκχυλισμάτων, των διαφόρων κλασμάτων και των απομονωμένων δευτερογενών μεταβολιτών έγινε χρήση αναλυτικής χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

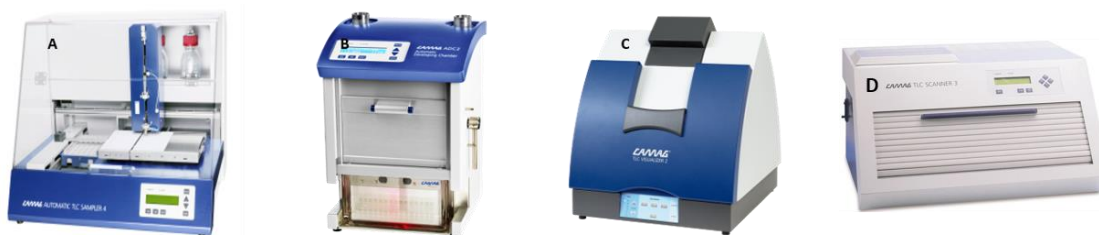
- Πλάκες αλουμινίου διαστάσεων 20 x 20 cm επιστρωμένες με γέλη οξειδίου του πυριτίου κανονικής φάσης (Silica gel 60 F₂₅₄- Merck)
- Πλάκες αλουμινίου διαστάσεων 20 x 20 cm επιστρωμένες με γέλη οξειδίου του πυριτίου αντίστροφης φάσης (RP-18 F₂₅₄)

Ο έλεγχος των χρωματογραφημάτων έγινε με λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας (σε μήκη κύματος 254 nm και 366 nm), ψεκασμό με διάλυμα θειϊκής βανιλίνης, θέρμανση και παρατήρηση στο ορατό.

7.4 Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας Υψηλής Απόδοσης (HPTLC)

Η τεχνική της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας υψηλής απόδοσης (High Performance Thin Layer Chromatography, HPTLC) χρησιμοποιήθηκε για να μελετηθεί με μεγαλύτερη ακρίβεια το φυτοχημικό περιεχόμενο των παραγόμενων εκχυλισμάτων αλλά και των κλασμάτων που παρελήφθησαν με χρωματογραφικές τεχνικές. Η διάταξη συσκευών (CAMAG) που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει:

- Αυτόματο δειγματολήπτη 'CAMAG Automatic TLC Sampler 4 (ATS 4)' με σύριγγα για την ομοιόμορφη εφαρμογή των δειγμάτων στις πλάκες με τη μορφή ψεκασμού (εξασφαλισμένη ακρίβεια και επαναληψιμότητα)
- Θάλαμο ανάπτυξης 'CAMAG Automatic Developing Chamber 2 (ADC 2)' για την ομοιόμορφη ανάπτυξη της χρωματογραφικής πλάκας ανεξάρτητα από τις περιβαλλοντικές συνθήκες (εξασφαλισμένη επαναληψιμότητα)
- Συσκευή οπτικοποίησης 'CAMAG TLC Visualizer' για την αποτύπωση και την αποθήκευση του χρωματογραφήματος ως έγχρωμη εικόνα στα 254 nm, 366 nm και στο ορατό
- Συσκευή σάρωσης 'CAMAG TLC Scanner 3' για την πυκνομετρική αξιολόγηση του χρωματογραφήματος και τη λήψη φασμάτων απορρόφησης
- Συσκευή 'CAMAG Chromatogram Immersion Device' για την ομοιόμορφη εμφάνιση των χρωματογραφικών πλακών στα αντιδραστήρια εμφάνισης
- Θεμαντική αυσκευή 'CAMAG TLC plate heater' για την ομοιόμορφη θέρμανση των εμβαπτισμένων στα αντιδραστήρια εμφάνισης χρωματογραφικών πλακών, με δυνατότητα ρύθμισης της θερμοκρασίας για την αποφυγή της υπερθέρμανσης της πλάκας



Εικόνα 55. Αλληλουχία συστημάτων HTLC: A) Αυτόματο δειγματολήπτη CAMAG Automatic TLC Sampler 4 (ATS 4), B) Θάλαμος ανάπτυξης CAMAG Automatic Developing Chamber 2 (ADC 2), C) CAMAG TLC Visualizer, D) CAMAG TLC Scanner 3

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν γυάλινες πλάκες επιστρωμένες με γέλη οξειδίου του πυριτίου (HPTLC Glass Plates from Merck, Silica gel 60 F₂₅₄) διαστάσεων 10 x 20 cm. Τα λογισμικά συστήματα (CAMAG) που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής: winCATS και visionCATS v2.5.

Μετά την τοποθέτηση των δειγμάτων επί των πλακών ακολούθησε η ανάπτυξη τους στον ειδικό θάλαμο ανάπτυξης, ενώ μετά την αποτύπωση της εικόνας τους στο ορατό και στο υπεριώδες (στα 254nm και 366nm) και τη σάρωση των χρωματογραφημάτων σε πολλαπλά μήκη κύματος (200, 254, 280, 366 nm), ακολούθησε η εμφάνιση με το αντιδραστήριο της θειικής

βανιλλίνης και η αποτύπωση της εικόνας τους στο ορατό. Η θειϊκή βανιλίνη παρασκευάζεται ως εξής:

- Διάλυμα Α : βανιλίνη 5% σε μεθανόλη
- Διάλυμα Β : π.Η₂SO₄ 5% σε μεθανόλη

Συγκεκριμένα ίσοι όγκοι αναμειγνύονται λίγο πριν την εμφάνιση των πλακών και στη συνέχεια αυτές θερμαίνονται για 1 min στους 100-110 °C.

7.5 Υγρή χρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας (LC – HRMS)

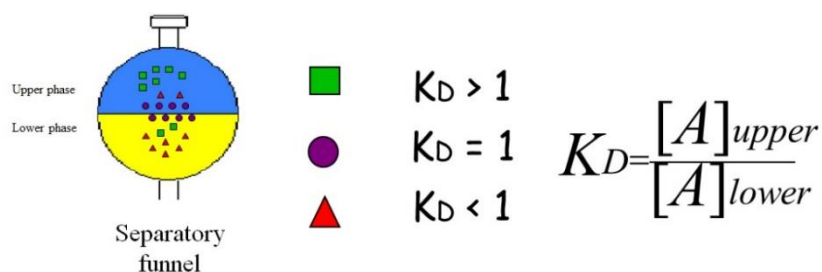
Για την ανάλυση του χημικού φορτίου των παρασκευασθέντων εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας υψηλής διαχωριστικής ικανότητας (Liquid Chromatography – High Resolution Mass Spectrometry, LC - HRMS). Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε είναι τύπου ‘Hybrid LTQ Orbitrap Discovery mass spectrometer’ της Thermo Scientific (Germany). Για όλα τα εκχυλίσματα παρασκευάστηκαν διαλύματα τελικής συγκέντρωσης 100 μg/mL (10% μεθανόλη σε νερό). Μέσω των αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν έγινε δυνατή η ανίχνευση ενός μεγάλου εύρους μεταβολιτών χαμηλού μοριακού βάρους. Για κάθε δείγμα παρελήφθησαν πειραματικά δεδομένα σε θετικό και αρνητικό ιονισμό. Οι μετρήσεις της ‘μάζας υψηλής ακρίβειας (highly accurate mass)’, οι προτεινόμενοι μοριακοί τύποι και οι τιμές για την παρουσία ακόρεστων δεσμών και αρωματικών δακτυλίων (Ring-Double bond equivalent (RDBeq)) σε συνδυασμό με τη βιβλιογραφία και τις διαδικτυακές βάσεις δεδομένων, χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των ουσιών μέσω του λογισμικού συστήματος Xcalibur™ της Thermo Fisher Scientific.

7.6 Φυγόκεντρος Χρωματογραφία Κατανομής (FCPC)

Η φυγόκεντρος χρωματογραφία κατανομής (Fast Centrifugal Partition Chromatography, FCPC) είναι μία από τις τεχνικές που εντάσσονται στην υγρή-υγρή χρωματογραφία. Αποτελεί εξέλιξη της χρωματογραφίας κατ’ αντιρροή (CCC), μια ομάδα τεχνικών η οποία αναπτύχθηκε το 1970 από τους Ito και Bowman. Η τεχνική του FCPC βασίζεται στην κατανομή των συστατικών μεταξύ δύο μη μειγνυόμενων φάσεων ενός συστήματος διαλυτών. Αποτελεί έναν τύπο υδροστατικής χρωματογραφίας κατ’ αντιρροή. Στα υδροστατικά συστήματα, ο μηχανισμός συγκράτησης της στατικής φάσης είναι μια υδροστατική δύναμη. Η πηγή της υδροστατικής δύναμης είναι ένα φυγόκεντρο πεδίο, το οποίο είναι πιο αποτελεσματικό συγκριτικά με τη

βαρύτητα όπου εφαρμόζεται σε άλλες τεχνικές (droplet countercurrent chromatography), καθώς οι φυγόκεντρες επιταχύνσεις ισοδυναμούν με εκατοντάδες γραμμάρια¹⁴².

Η τεχνική διαχωρισμού FCPC λειτουργεί με βάση τις αρχές της υγρής-υγρής χρωματογραφίας κατανομής, δηλαδή δύο μη μειγνυόμενα υγρά τα οποία μπορούν να παραμένουν σε ισορροπία και να σχηματίζουν ένα διφασικό σύστημα, έρχονται σε επαφή, γαλακτωματοποιούνται και διαχωρίζονται πολλές φορές. Μια από τις δύο φάσεις τοποθετείται στην περιστρεφόμενη στήλη και συγκρατείται εκεί ως η στατική φάση, ενώ η άλλη διέρχεται μέσω αυτής και αποτελεί την κινητή φάση. Λόγω των δυνάμεων (shear forces) οι οποίες αναπτύσσονται μεταξύ των δύο φάσεων, η κινητή φάση διασκορπίζεται μέσα στην στατική φάση, παρέχοντας μια διεπιφανειακή περιοχή που επιτρέπει τη μεταφορά μάζας. Η κινητή φάση διαπερνά τη στατική φάση. Ο διαχωρισμός των διαλυμένων ουσιών, επιτυγχάνεται με βάση τη διαφορετικότητα του συντελεστή κατανομής (K_D), ο οποίος εκφράζεται ως ο λόγος της συγκέντρωσης στη στατική φάση προς τη συγκέντρωση στην κινητή φάση. Ένα σύστημα διαλυτών όπου η τιμή K_D ενός συστατικού τείνει στο ένα, καθιστά το προς ανάλυση σύστημα ιδανικό για το διαχωρισμό της ουσίας. Μικρές τιμές K_D οδηγούν σε μειωμένη διαχωριστική ικανότητα ενώ μεγάλες τιμές προκαλούν εκτεταμένη διεύρυνση της ζώνης ενός δείγματος και αυξημένους χρόνους ανάλυσης. Η απόφαση για το ποια φάση (πάνω ή κάτω) θα αποτελέσει την κινητή φάση δεν είναι τόσο σημαντική όταν ο $K_D=1$, καθώς ο όγκος ανάκτησης της ουσίας-στόχου θα είναι παραπλήσιος σε κάθε περίπτωση¹⁴³. Συστατικά τα οποία παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγγένεια με την κινητή φάση εκλούνται πιο νωρίς σε σχέση με αυτά που παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγγένεια με τη στατική φάση¹⁴².



Εικόνα 56. Διχωρισμός ουσιών με βάση το συντελεστή κατανομής (K_D)

Η οργανολογία που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή είναι η παρακάτω:

- Στήλη FCPC υδροστατικού τύπου της εταιρείας Kromaton (Angers, France), η οποία αποτελείται από πολλούς, σχεδόν πανομοιότυπους δίσκους, τοποθετημένους τον έναν πάνω

στον άλλο. Κάθε δίσκος φέρει μια σειρά από χαραγμένα κελιά (θάλαμοι ή κανάλια) τα οποία συνδέονται με στενούς αγωγούς. Οι δίσκοι απομονώνονται με διαχωριστικό κυκλικό δίσκο (plate seal), κατασκευασμένο συνήθως από PTFE. Μέσω ενός μικρού συνδετικού κρίκου (eyelet), το τελευταίο κελί του ενός δίσκου συνδέεται με το πρώτο κελί του επόμενου δίσκου. Το σύνολο των προαναφερόμενων δίσκων αποτελούν τη χρωματογραφική στήλη (rotor), η οποία τοποθετείται σε έναν άξονα φυγόκεντρησης. Στους εμπορικά διαθέσιμους ρότορες εκατοντάδες (ή περισσότερα, κάποιες φορές πάνω από 2000) κανάλια (κελιά) είναι συνδεδεμένα. Καθώς οι φάσεις διοχετεύονται στο ρότορα, παρουσία φυγόκεντρου δύναμης, η στήλη δημιουργείται μέσα στα κανάλια (κελιά) και στους αγωγούς του ρότορα. Ο όγκος της στήλης ισοδυναμεί με τον εσωτερικό όγκο του ρότορα και εξαρτάται από το συνολικό όγκο των καναλιών (κελιών) και των αγωγών. Στα κλασικά μοντέλα ισχύει η δημιουργία μιας θεωρητικής πλάκας ανά κανάλι. Σήμερα επικρατεί η άποψη ότι η αύξηση της ταχύτητας περιστροφής του ρότορα, ξεπερνά τον περιορισμό της μιας θεωρητικής πλάκας ανά κανάλι. Σε πολύ ισχυρές φυγόκεντρες δυνάμεις κάποιες παράμετροι υδροδυναμικής αλλάζουν ως μια λειτουργία της φυγόκεντρης επιτάχυνσης. Αυτό σημαίνει ότι ισχυρότερες φυγόκεντρες δυνάμεις υποστηρίζουν τη δημιουργία ζωνών διάχυσης, με αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των θεωρητικών πλάκων. Η ροή του διαλύτη και η ταχύτητα περιστροφής του ρότορα περιορίζονται από τη μέγιστη επιτρεπόμενη πίεση λειτουργίας ¹⁴².

- Αντλία LabAlliance
- Loop εισαγωγής δείγματος χωρητικότητας 30 mL
- Αυτόματος συλλέκτης κλασμάτων Buchi C-660



Εικόνα 57. Συσκευή Φυγόκεντρου Χρωματογραφίας Κατανομής (FCPC)

Αναλόγως την πυκνότητα των φάσεων που χρησιμοποιούνται, απατώνται δύο κύριοι τρόποι λειτουργίας. Η χρωματογραφία μπορεί να πραγματοποιείται σε ανιούσα λειτουργία (ascending mode) εάν η φάση που χρησιμοποιείται ως κινητή είναι ελαφρύτερη. Στην περίπτωση

που η κινητή φάση είναι η βαρύτερη, η χρωματογραφία πραγματοποιείται σε κατιούσα λειτουργία (descending mode). Τις περισσότερες φορές η ελαφρύτερη φάση είναι λιγότερο πολική από τη βαρύτερη. Για το λόγο αυτό κάποιες φορές η ανιούσα λειτουργία καλείται επίσης λειτουργία κανονικής φάσης και η κατιούσα, λειτουργία αντίστροφης φάσης. Παρ' όλα αυτά υπάρχουν πολλές εξαιρέσεις σε αυτόν τον κανόνα, όπως στις περιπτώσεις του χλωροφορμίου και του διχλωρομεθανίου τα οποία είναι πιο πυκνά από το νερό. Υπάρχει η δυνατότητα, κατά τη διάρκεια της χρωματογραφικής ανάλυσης, να αντιστραφεί ο ρόλος της κάθε φάσης και η προηγούμενη στατική φάση γίνεται νέα κινητή, ενώ η προηγούμενη κινητή φάση γίνεται νέα στατική. Αυτή η μεθοδολογία καλείται διπλής λειτουργίας (dual mode). Παρότι ως διαδικασία ακολουθείται σπάνια, παρέχει μια σειρά πλεονεκτημάτων όπως αύξηση θεωρητικών πλακών και συνεπώς βελτίωση διαχωριστικής ικανότητας ή μείωση του χρόνου της διαδικασίας. Επιπλέον είναι δυνατόν να εφαρμοσθεί η διαδικασία βαθμιδωτής έκλουσης-εξώθησης η οποία αποτελεί μια άλλη οδό για την παραλαβή συστατικών που συγκρατούνται ισχυρώς από τη στήλη χωρίς να καταναλώνονται μεγάλες ποσότητες διαλυτών. Η μεθοδολογία περιλαμβάνει δύο στάδια. Αρχικά μια διαδικασία κανονικής έκλουσης λαμβάνει χώρα ενώ στη συνέχεια η υπάρχουσα στατική φάση εξωθείται από τη στήλη, καθώς νέα στατική φάση διοχετεύεται στο σύστημα με την ίδια λειτουργία (ανιούσα ή κατιούσα) που χρησιμοποιήθηκε στο πρώτο βήμα της διαδικασίας¹⁴².

Επίσης οι περισσότεροι διαχωρισμοί CPC είναι ισοκρατικοί. Αυτού του τύπου οι διαχωρισμοί έχουν αρκετά πλεονεκτήματα, όπως καλύτερη διακριτότητα των γειτονικών κορυφών, εφόσον γίνει επιλογή των κατάλληλων διαλυτών που θα σχηματίσουν τις δύο φάσεις. Το συγκεκριμένο πλεονέκτημα είναι κοινό για όλες τις τεχνικές υγρής χρωματογραφίας, αλλά η χρήση ισοκρατικών συστημάτων είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη χρωματογραφία κατ' αντιρροή καθώς η στατική φάση συγκρατείται καλύτερα μέσα στη στήλη. Αυτό βέβαια εξαρτάται από τον τύπο του δείγματος που αναλύεται (π.χ. περιπτώσεις αμφιφιλικής) και/ή το σύστημα διαλυτών. Με τις κατάλληλες επιλογές στο σύστημα έκλουσης, τη ροή και την ταχύτητα περιστροφής, η απώλεια στατικής φάσης μπορεί να είναι μικρότερη από 2%/h στο CPC (από τη στιγμή της εξισορρόπησης). Στην περίπτωση της βαθμιδωτής έκλουσης, η στατική φάση χάνεται εν μέρει. Ωστόσο αυτός ο τρόπος διαχωρισμού είναι μια κατάλληλη εναλλακτική επιλογή για τη διεξαγωγή διαχωρισμών συστατικών πολύπλοκων δειγμάτων με διακριτές διαφορές στους συντελεστές κατανομής. Κάποιες φορές η βαθμιδωτή έκλουση εφαρμόζεται με σκοπό την ελάττωση του χρόνου ανάλυσης. Σε αυτήν την περίπτωση η σύσταση της κινητής φάσης αλλάζει κατά τη

διάρκεια του διαχωρισμού, σε αντίθεση με τη στατική φάση η οποία παραμένει αμετάβλητη (στην πραγματικότητα η στατική φάση αλλάζει στο σημείο εξισορρόπησης με την τελική κινητή φάση). Η αλλαγή της θα πρέπει να είναι μικρή καθώς όσο μικρότερες μεταβολές συμβαίνουν κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού τόσο λιγότερες απώλειες στατικής φάσης παρατηρούνται. Δεν είναι όμως όλοι οι διαλύτες κατάλληλοι για την πραγματοποίηση βαθμιδωτής έκλουσης. Οι διαδικασίες διαχωρισμών με χρήση βαθμιδωτής έκλουσης έχουν βρει εφαρμογή στο διαχωρισμό αμινοξέων και πεπτιδίων με διφασικά συστήματα αποτελούμενα από εξάνιο/1-βουτανόλη/νερό, ανθοκυανών με διφασικά συστήματα αποτελούμενα από οξικό αιθυλεστέρα/1-βουτανόλη/νερό, κινολινών με συστήματα επτανίου/νερού/ακετονιτριλίου και επτανίου/ακετονιτριλίου/μεθανόλης και σεσκιτερπενικών λακτονών με συστήματα επτανίου/οξικού αιθυλεστέρα/μεθανόλης/νερού¹⁴².

Η διαχωριστική ικανότητα της τεχνικής CPC επηρεάζεται από μια ποικιλία παραμέτρων οι οποίες ταξινομούνται σε 4 κατηγορίες: 1) είδος-τύπος δείγματος (πολικότητα, διαλυτότητα, φορτίο, ευαισθησία, συντελεστές κατανομής συστατικών ($0.2 < K_D < 5.0$)¹⁴⁴, όγκος ένεσης), 2) σύστημα διαλυτών (διεπιφανειακή τάση, πυκνότητα, ιξώδες), 3) δυνατότητες οργάνου (δυνατότητες κελιών όπως σχήμα, μέγεθος, όγκος, υλικό κατασκευής κελιών και αγωγών) και 4) παράμετροι εφαρμοζόμενων μεθόδων (τρόπος λειτουργίας (π.χ. χρήση πάνω ή κάτω φάσης ως κινητή), ροή κινητής φάσης, ταχύτητα περιστροφής του ρότορα, όγκος και συγκέντρωση δείγματος που ενίεται)¹⁴².

Στη φυγόκεντρο χρωματογραφία κατανομής χρησιμοποιούνται συχνά διφασικά συστήματα διαλυτών τα οποία ανήκουν σε δύο μεγάλες ομάδες διφασικών συστημάτων: α) τα συστήματα ARIZONA (ή HEMWat), τα οποία αποτελούνται από επτάνιο (ή εξάνιο), οξικό αιθυλεστέρα, μεθανόλη και νερό (τροποίηση αυτού αποτελούν τα συστήματα OKA (ή extended ARIZONA) στα οποία έχει προστεθεί ως πέμπτος διαλύτης η 1-βουτανόλη)¹⁴⁵ και β) τα συστήματα της ακετόνης τα οποία αποτελούνται από επτάνιο, τολουόλιο, ακετόνη και νερό¹⁴³.

Η Χρωματογραφία Κατανομής με Φυγόκεντρηση (FCPC) εφαρμόζεται σε ευρεία κλίμακα και με μεγάλη επιτυχία στο πεδίο των φυσικών προϊόντων¹⁴⁶, καθώς προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα, συγκρινόμενη με άλλες συμβατικές μεθόδους διαχωρισμού, όπως είναι η υγρή χρωματογραφία ανοικτής στήλης ή η υγρή χρωματογραφία μέσης και υψηλής πίεσεως. Τα πλεονεκτήματα αυτά συνοψίζονται παρακάτω^{142 146}:

- **Υψηλή Απόδοση:** Απομονώσεις ουσιών υψηλής καθαρότητας και σε μεγάλη ποσότητα ανάλογα με το συντελεστή κατανομής τους στις δύο φάσεις
- **Υψηλή ανάκτηση του δείγματος:** Λόγω της υγρής φύσης της στατικής φάσης και της απουσίας οποιουδήποτε στερεού υλικού, γίνεται πλήρης παραλαβή του δείγματος (αποφυγή προσρόφησης σε στερεή στατική φάση) και αποφεύγονται οι επιμολύνσεις από προηγούμενες αναλύσεις
- **Ευρείας κλίμακας διαχωρισμοί:** Μπορούν να γίνουν αναλύσεις μεγάλου εύρους ποσοτήτων δείγματος (mg έως kg)
- **Χαμηλό κόστος:** Οι ποσότητες οργανικών διαλυτών που καταναλώνονται είναι κατά 10-50% μικρότερες σε σύγκριση με την υγρή χρωματογραφία (LC), ενώ δεν απαιτείται η χρήση υψηλής καθαρότητας και κόστους όπως στην παρασκευαστική HPLC
- **Υψηλή εκλεκτικότητα:** Ανάλογα με την πολικότητα των περιεχόμενων συστατικών του μείγματος, είναι δυνατή η επιλογή κατάλληλου συστήματος διαλυτών μέσα από μια μεγάλη δεξαμενή συστημάτων
- **Ασφαλής χειρισμός:** Ο διαχωρισμός γίνεται σε στεγανοποιημένη στήλη κατασκευασμένη από ατσάλι και έτσι αποφεύγεται η πρόκληση ατυχημάτων και η απώλεια διαλυτών

Γενικότερα αποτελεί τεχνική φιλική προς το περιβάλλον, η υγρή φύση της στατικής φάσης επιτρέπει τον ευκολότερο καθαρισμό του εξοπλισμού, δεν παρατηρείται μείωση της διαχωριστικής ικανότητας κατά την πιλοτική εφαρμογή (σε αντίθεση με τις χρωματογραφίες που χρησιμοποιείται στερεή στατική φάση όπου κατά την πιλοτική κλίμακα μειώνεται δραματικά η διαχωριστική αποτελεσματικότητα), υπάρχει δυνατότητα υψηλής χωρτικότητας της στήλης με συνέπεια να επιτρέπεται η ανάλυση πυκνών δειγμάτων με μικρότερο κίνδυνο υπερφόρτωσης της στήλης και παρατηρείται σημαντικού βαθμού επαναληψιμότητα ^{142 147}.

Το μεγαλύτερο μειονέκτημα αυτής της υγρής-υγρής χρωματογραφικής τεχνικής είναι η αναπόφευκτη ανάγκη ανεύρεσης κατάλληλου συστήματος διαχωρισμού για κάθε νέο δείγμα, διαδικασία που απαιτεί χρόνο. Άλλα προβλήματα είναι ότι ως τεχνική δεν είναι τόσο ευρέως γνωστή, η διαδικασία εύρεσης των βέλτιστων συνθηκών του πειράματος είναι συχνά χρονοβόρα καθώς υπάρχει ανάγκη καθορισμού των συστημάτων διαλυτών και της μεθόδου έκλουσης, διαδικασία η οποία προϋποθέτει την καλή ανάπτυξη της αναλυτικής τεχνικής στο εργαστήριο.

Υπάρχει επίσης ο κίνδυνος σχηματισμού γαλακτώματος, ο οποίος συνήθως παρατηρείται σε περιπτώσεις πολύ πυκνών δειγμάτων και μπορεί να οδηγήσει μέχρι και στην πλήρη εξώθηση της στατικής φάσης, ενώ σημαντικό είναι και το γεγονός ότι σε μικρής κλίμακας διαχωρισμούς η διαχωριστική ικανότητα είναι μικρότερη συγκρινόμενη με αυτή της ημιπαρασκευαστικής HPLC¹⁴².

Η επιλογή του κατάλληλου συστήματος διαλυτών μπορεί να απαιτήσει το 90% του χρόνου που χρειάζεται η ολοκλήρωση μιας φυτοχημικής μελέτης με CPC. Για το λόγο αυτό τις περασμένες δεκαετίες αναπτύχθηκαν τρεις κατηγορίες στρατηγικών εύρεσης κατάλληλου συστήματος οι οποίες είναι η εμπειρική, η ημι-εμπειρική και η θεωρητική. Στην κατηγορία της εμπειρικής μεθόδου ο ερευνητής θα πρέπει να επιλέξει τόσο τους διαλύτες που θα αποτελέσουν το σύστημα όσο και τις αναλογίες τους. Οι κλασικές εφαρμογές μπορούν να χωριστούν σε τρεις ομάδες οι οποίες είναι η απομόνωση ενός συστατικού-στόχου, ο διαχωρισμός και η απομόνωση συγκεκριμένης κατηγορίας συστατικών και η βέλτιστη κατανομή μάζας και/ή βιολογικής δράσης. Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής σε κάθε διερεύνηση κατάλληλου συστήματος διαλυτών ήταν επιθυμητή η παρατήρηση της τρίτης περίπτωσης. Ο εμπειρικός τρόπος εύρεσης ενός συστήματος αποτελεί μια επαναλαμβανόμενη διαδικασία. Αφότου τα αποτελέσματα γίνουν γνωστά από την πρώτη σειρά δοκιμών, η δεύτερη σειρά δοκιμών σχεδιάζεται. Ορισμένες φορές το βέλτιστο σύστημα μπορεί να βρεθεί με την προσαρμογή της αναλογίας διαλυτών εντός μιας οικογένειας (μεγάλης ομάδας όπως προαναφέρθηκε) συστημάτων διαλυτών. Για παράδειγμα, εάν μια ουσία-στόχος εμφανίζει υψηλή συγγένεια με την οργανική φάση ενός συστήματος διαλυτών εξάνιο / οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη / νερό (HEMWat), οι αναλογίες εξανίου και/ή μεθανόλης συγκριτικά με του οξικού αιθυλεστέρα και/ή νερού μπορούν να αυξηθούν στην επόμενη σειρά δοκιμών. Από την άλλη ένα σύστημα διαλυτών με μια διαφορετική σύσταση από αυτήν του αρχικού συστήματος είναι δυνατόν να δοκιμαστεί εάν α) δεν υπάρχει ικανοποιητική αντιστοιχία πολικότητας και/ή διαλυτότητας ανάμεσα στο αρχικό σύστημα διαλυτών και στις ουσίες-στόχους, β) οι ουσίες-στόχοι διαλύονται μη επαρκώς σε διαφορετικές μορφές της οικογένειας συστημάτων διαλυτών και γ) δημιουργούνται γαλακτώματα με το εκχύλισμα τα οποία μπορεί να οδηγήσουν σε φτωχό διαχωρισμό.

Συγκεκριμένα, σε κάθε δοκιμασία εύρεσης κατάλληλου συστήματος διαλυτών (βαθμιδωτή ή ισοκρατική έκλυση), αφότου είχε μελετηθεί η βιβλιογραφία σχετικά με τον τρόπο διαχωρισμού των εκάστοτε κατηγοριών δευτερογενών μεταβολιτών, ακολουθήθηκε η

παρακάτω διαδικασία (μέθοδος 'shake flask')¹⁴³: 15-20 mg εκχυλίσματος ζυγίζονται και τοποθετούνται εντός δοκιμαστικού σωλήνα. Κατόπιν γίνεται προσθήκη του συστήματος διαλυτών συνολικού όγκου 5mL (πρώτα 2.5 mL της φάσης που διαλύει το δείγμα και εν συνεχεία 2.5 mL της άλλης φάσης) και ανατάραξη του δοκιμαστικού σωλήνα με τη βοήθεια vortex. Το σύστημα διαλυτών που επιλέγεται να δοκιμαστεί πρέπει προηγουμένως να έχει ελεγχθεί χωρίς δείγμα και να πληροί τέσσερα βασικά κριτήρια τα οποία είναι: πρώτον δημιουργία δύο μη μειγνυόμενων φάσεων, δεύτερον αποφυγή εμφάνισης γαλακτώματος, τρίτον γρήγορος διαχωρισμός φάσεων που επιτυγχάνεται εντός 60 s και τέλος αναλογία των δύο φάσεων κατά προσέγγιση 1:1. Όταν οι δύο φάσεις ηρεμήσουν εντός σύντομου χρονικού διαστήματος, με καλή αναλογία και χωρίς τη δημιουργία γαλακτώματος, τότε γίνεται απόθεση σε TLC του αρχικού εκχυλίσματος και του περιεχομένου των δύο φάσεων και ανάπτυξη της πλάκας σε κατάλληλο σύστημα προκειμένου να ελεγχθεί η κατανομή των συστατικών. Στην περίπτωση βαθμιδωτής έκλυσης, αφότου δοκιμαστεί το πρώτο σύστημα, απορρίπτεται η πρώτη κινητή φάση αφού πρώτα έχει χρωματογραφηθεί και γίνεται προσθήκη της κινητής φάσης του δεύτερου συστήματος η οποία έχει παρασκευασθεί σε ξεχωριστό δοκιμαστικό σωλήνα και ακολουθούν οι κινητές τρίτου, τέταρτου κ.ο.κ συστήματος. Στο τέλος, χρωματογραφούνται το αρχικό εκχύλισμα, όλες οι κινητές φάσεις αλλά και η τελική στατική φάση και παρατηρείται η κατανομή των ουσιών.

7.7 Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού (SEC)

Στη χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (Size Exclusion Chromatography, SEC) ως στατική φάση χρησιμοποιούνται μη προσροφητικές πορώδεις πηκτές από ορισμένα διασυνδεόμενα πολυμερή, τα οποία φέρουν διάφορες ομάδες, όπως υδροξυλομάδες, αμιδικές ομάδες κ.ά. Στην παρούσα εργασία το πληρωτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για τους διαχωρισμούς των δευτερογενών μεταβολιτών ήταν Sephadex LH-20, γέλη υδροξυπροπυλωμένης δεξτράνης (Pharmacia Fine Chemicals) με μέγεθος κόκκων 25-100 μ. Τα υλικά αυτά έχουν τη δυνατότητα προσρόφησης διαφόρων διαλυτών και σχηματισμού σφαιριδίων διαφορετικού μεγέθους, γι' αυτό και πριν από τη χρήση αφήνονται να διογκωθούν οι κόκκοι της γέλης στο διαλύτη έκλυσης (επί 24 ώρες) μέσω διάνοιξης της δομής των διασυνδεόμενων πολυμερών αλυσίδων. Ακολούθως, η στατική φάση φέρεται στη στήλη και εκπλένεται με τον ίδιο διαλύτη αρκετές φορές (αντενδείκνυται η μηχανική και κυρίως η μαγνητική ανάδευση και η χρήση υπερήχων, διότι καταστρέφονται οι κόκκοι). Με τη χρήση κατάλληλου διαλύτη ή μείγματος διαλυτών (κινητή φάση) επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των

ουσιών του μείγματος με βάση το μοριακό τους μέγεθος. Τα μεγάλα μόρια δεν μπορούν να εισέλθουν στο δίκτυο της πηκτής, συνεπώς ελίσσονται μεταξύ των κόκκων και εκλούνται πρώτα, ενώ τα μικρότερα μόρια που εισχωρούν στους πόρους κινούνται πιο αργά μέσα στη στήλη. Λόγω του ότι το υλικό πλήρωσης είναι αδρανές υπάρχει μεγάλο ποσοστό ανάκτησης.

7.8 Παρασκευαστική Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (Prep - TLC)

Η παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Preparative TLC, Prep – TLC) πραγματοποιήθηκε σε γυάλινες πλάκες με επίστρωση πυριτίου (Silica gel 60 F₂₅₄-Merck). Για την ανάπτυξη των χρωματογραφημάτων χρησιμοποιήθηκαν μείγματα οργανικών διαλυτών σε συγκεκριμένες αναλογίες μετά από έλεγχο σε απλές πλάκες αλουμινίου.

7.9 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Τα απομονωμένα συστατικά των εκχυλισμάτων, μετά την απομάκρυνση του διαλύτη με εξάτμιση υπό κενό σε συσκευή 'rotavapor' και την εφαρμογή υψηλού κενού, διαλύθηκαν σε δευτεριωμένους διαλύτες. Στη συνέχεια, στα διαλύματα πραγματοποιήθηκε λήψη φασμάτων μιας (1D-NMR) και δύο διαστάσεων (2D-NMR). Για την λήψη των 1D φασμάτων Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) χρησιμοποιήθηκαν οι συσκευές Brüker AC 200 MHz, Brüker DRX 400 (399.95 MHz) και Brüker Avance III 600 MHz (λήψη και των 2D φασμάτων). Οι δευτεριωμένοι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η μεθανόλη (MeOD) (σήμα διαλύτη ¹H-NMR: 3.33 ppm, ¹³C-NMR: 49.5 ppm), το χλωροφόρμιο (CDCl₃) (σήμα διαλύτη ¹H-NMR: 7.23 ppm, ¹³C-NMR: 77.0 ppm), η ακετόνη (CD₃)₂CO-*d*₆ (σήμα διαλύτη ¹H-NMR: 2.09 ppm, ¹³C-NMR: 205.8 ppm) και το διμεθυλοσουλφοξείδιο (CD₃)₂SO-*d*₆ (σήμα διαλύτη ¹H-NMR: 2.54 ppm, ¹³C-NMR: 40.4 ppm). Οι διαλύτες αυτοί προήλθαν από τις εταιρείες Merck KGaA Darmstadt, Germany και Euriso-top.

Πιο συγκεκριμένα ελήφθησαν τα ακόλουθα φάσματα:

- ¹H-NMR
- COSY (Correlation Spectroscopy)
- HSQC-DEPT (Heteronuclear Single Quantum Coherence - Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)
- HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)

Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν το TopSpin™. Από τη μελέτη των φασμάτων προέκυψαν συμπεράσματα σχετικά με τα δομικά χαρακτηριστικά των απομονωμένων ουσιών

και μέσω της σύγκρισης των πειραματικών τιμών με δεδομένα της βιβλιογραφίας έγινε δυνατή η ταυτοποίησή τους. Οι χημικές μετατοπίσεις (δ) είναι εκφρασμένες σε ppm ενώ οι σταθερές σύζευξης (J) σε Hz. Η πολλαπλότητα των κορυφών εκφράζεται ως s (απλή), brs (ευρεία απλή), d (διπλή), t (τριπλή), q (τετραπλή), dd (διπλή-διπλής) και m (πολλαπλή).



Εικόνα 58. Συσκευή πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR Bruker Avance III 600 MHz

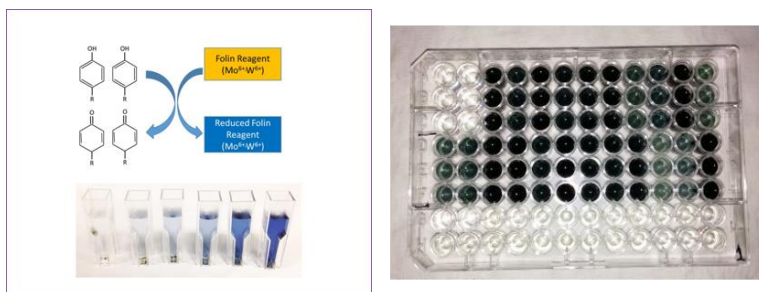
7.10 Χρωματομετρικές Μέθοδοι

7.10.1 Αξιολόγηση του χημικού φορτίου

➤ Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC)

Αρχή μεθόδου

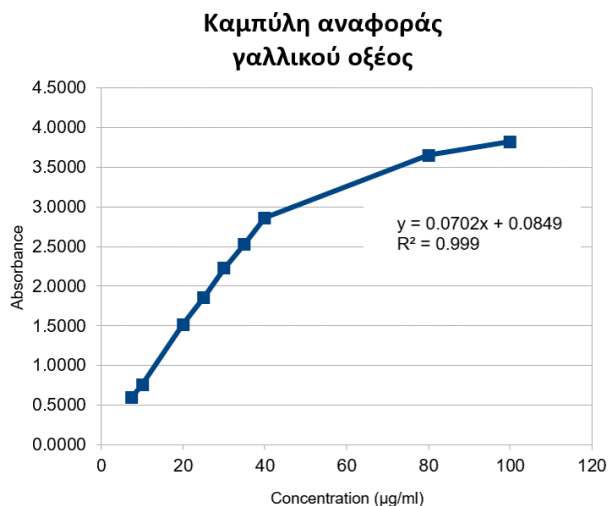
Η περιεκτικότητα των ολικών εκχυλισμάτων σε φαινολικά παράγωγα (Total phenolic content, TPC) υπολογίστηκε με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu σε μικροπλάκα 96 κελιών¹⁴⁸. Παρασκευάστηκαν λίγη ώρα προτού χρησιμοποιηθούν τα εξής: διάλυμα Folin – Ciocalteu 10% (v/v) και υδατικό διάλυμα Na_2CO_3 7.5% (w/v). Το κύριο αντιδραστήριο της μεθόδου, το αντιδραστήριο Folin - Ciocalteu, αποτελεί διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφο-μολυβδαινικά ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) και φωσφο-βολφραμικά ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) ετεροπολυμερή οξέα. Τα φαινολικά ιόντα οξειδώνονται με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων. Κατά την οξείδωση των φαινολών, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu ανάγεται προς μείγμα κυανών οξειδίων του μολυβδαινίου (Mo_8O_{23}) και του βολφραμίου (W_8O_{23}). Το σχηματιζόμενο κυανό χρώμα παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση περίπου στα 765 nm και είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με διάλυμα Na_2CO_3 . Οι φαινολικές ουσίες που προσδιορίζονται με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu εκφράζονται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος. Τα εκχυλίσματα αξιολογήθηκαν στη συγκέντρωση των 4 mg/mL σε DMSO (τελική συγκέντρωση 0.4 mg/mL).



Εικόνα 59. Μέθοδος Folin – Ciocalteu για τον προσδιορισμό ολικών φαινολικών

Πειραματική πορεία

Το πρωτόκολλο για τον υπολογισμό των ολικών φαινολικών, σε μικροπλάκα 96 κελιών, περιλαμβάνει την προσθήκη 25 μL δείγματος, 125 μL αραιωμένου διαλύματος Folin – Ciocalteu και 100 μL διαλύματος Na_2CO_3 . Ακολουθεί επώαση του μείγματος για 30 min στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια μέτρηση της απορρόφησης στα 765 nm. Για κάθε δείγμα υπήρξε μέτρηση της απορρόφησης απουσία αντιδραστηρίου Folin – Ciocalteu (blank) η οποία αφαιρέθηκε από τη μέτρηση της απορρόφησης του τελικού μείγματος. Κάθε μέτρηση επαναλήφθηκε τρεις φορές. Πριν από την αξιολόγηση των δειγμάτων κατασκευάστηκε *καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος* με διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Η καμπύλη που προέκυψε φαίνεται στην εικόνα που ακολουθεί:



Εικόνα 60. Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος

Η εξίσωση που περιγράφει τη σχέση απορρόφησης – συγκέντρωσης γαλλικού οξέος είναι:

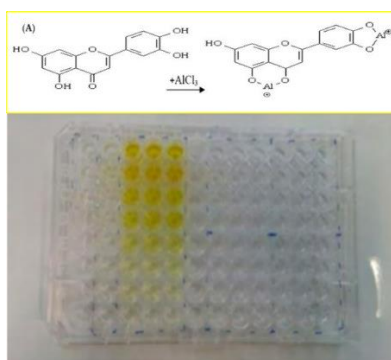
$$y = 0.0702 * x + 0.0849$$

Στη συνέχεια, από το γραμμικό τμήμα της καμπύλης (με όρια $0.600 < A < 2.860$) και με την εφαρμογή της εξίσωσης, υπολογίζεται η αντίστοιχη συγκέντρωση γαλλικού οξέος και εν συνεχεία η ισοδύναμη συγκέντρωση σε μg γαλλικού οξέος/ mg εκχυλίσματος.

➤ Προσδιορισμός ολικών περιεχομένων φλαβονοειδών (TFC)

Αρχή μεθόδου

Η αξιολόγηση των εκχυλισμάτων ως προς την περιεκτικότητά τους σε ολικά φλαβονοειδή (Total Flavonoid Content, TFC) έγινε με βάση τη μέθοδο που προτάθηκε από τους Chatatikun και Chiabchalard (2013)¹⁴⁹. Παρασκευάστηκαν, λίγη ώρα προτού χρησιμοποιηθούν, τα διαλύματα 10% AlCl_3 και 1 M οξικού νατρίου (sodium acetate, $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$). Τα εκχυλίσματα αξιολογήθηκαν σε συγκέντρωση 1.5 mg/mL σε DMSO (τελική συγκέντρωση 0.3 mg/mL).

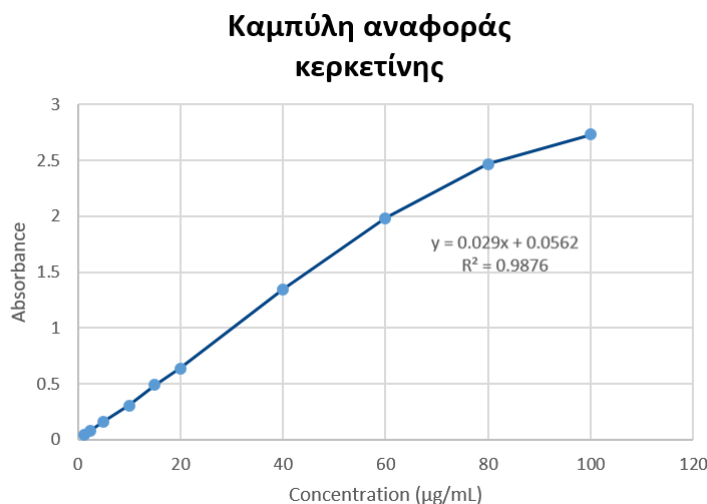


Εικόνα 61. Προσδιορισμός ολικών περιεχομένων φλαβονοειδών

Πειραματική πορεία

Το πρωτόκολλο για τον υπολογισμό των περιεχομένων ολικών φλαβονοειδών περιλαμβάνει αρχικά την προσθήκη 50 μL δείγματος στη μικροπλάκα 96 κελιών, 20 μL αραιωμένου διαλύματος AlCl_3 , 160 μL αιθανόλης και 20 μL διαλύματος $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$. Το μείγμα αφήνεται για 40 min στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου και εν συνεχεία μετράται η απορρόφηση του σχηματιζόμενου έγχρωμου συμπλόκου στα 415 nm. Ομοίως με την παραπάνω μέθοδο η ένταση της απορρόφησης εξαρτάται από την περιεκτικότητα του εκχυλίσματος σε φλαβονοειδή ενώ για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε μέτρηση χωρίς AlCl_3 (blank) και διορθώθηκε η τελική απορρόφηση. Κάθε μέτρηση επαναλήφθηκε τρεις φορές. Προκειμένου να υπολογιστεί το συνολικό φορτίο φλαβονοειδών των εκχυλισμάτων προηγήθηκε η κατασκευή καμπύλης αναφοράς κερκετίνης. Μετρήθηκε η απορρόφηση των διαλυμάτων κερκετίνης γνωστής συγκέντρωσης (100 $\mu\text{g/mL}$, 80 $\mu\text{g/mL}$, 60 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 15 $\mu\text{g/mL}$, 10

μg/mL, 5 μg/mL, 2.5 μg/mL και 1.25 μg/mL) από όπου και κατασκευάστηκε η ακόλουθη καμπύλη αναφοράς:



Εικόνα 62. Καμπύλη αναφοράς κερκετίνης

Η εξίσωση που περιγράφει τη σχέση απορρόφησης – συγκέντρωσης κερκετίνης είναι:

$$y = 0.029 * x + 0.0562$$

Στη συνέχεια, από το γραμμικό τμήμα της καμπύλης (με όρια $0.160 < A < 2.732$) και με τη βοήθεια της εξίσωσης, υπολογίζεται η αντίστοιχη συγκέντρωση κερκετίνης και εν συνεχεία η ισοδύναμη συγκέντρωση σε μg κερκετίνης/mg εκχυλίσματος.

7.10.2 Αξιολόγηση της βιολογικής δράσης

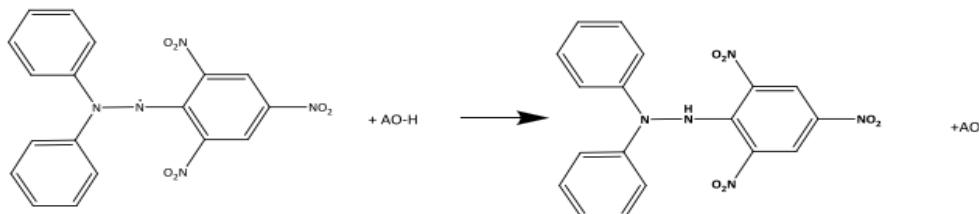
➤ Αξιολόγηση αντιοξειδωτικής δράσης

Η αντιοξειδωτική δράση των ολικών εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο του διφαινυλοπικρυλυδραζιλίου-DPPH.

Αρχή μεθόδου

Η μέτρηση της ικανότητας εξουδετέρωσης της ελεύθερης ρίζας DPPH αποτελεί την πιο κοινή αντιοξειδωτική δοκιμασία για την αξιολόγηση των φυσικών προϊόντων. Το χαμηλό κόστος, η απλή εκτέλεση και η μεγάλη ευαισθησία της μεθόδου αποτελούν τα βασικότερα πλεονεκτήματά της. Το DPPH• (2,2 –διφαινυλο-1-πικρυλυδραζίλιο) συνιστά μια σταθερή ρίζα, το οργανικό διάλυμα της οποίας παρουσιάζει έντονο ιώδες (μωβ) χρώμα. Τα αντιοξειδωτικά συστατικά των εκχυλισμάτων που έχουν την ικανότητα να δίνουν εύκολα ένα άτομο υδρογόνου και να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα, προκαλούν τον αποχρωματισμό του διαλύματος από

έντονο ιώδες σε υποκίτρινο. Η ελάττωση της απορρόφησης μετράται στα 517 nm¹⁵⁰. Η μείωση της έντασης της απορρόφησης αντιστοιχεί στη μείωση της ποσότητας της ελεύθερης ρίζας και στην αντιοξειδωτική ισχύ του φυσικού προϊόντος.



Εικόνα 63. Μηχανισμός αντίδρασης εξουδετέρωσης ελεύθερης ρίζας DPPH

Πειραματική πορεία

Παρασκευάστηκε αιθανολικό διάλυμα ελεύθερης ρίζας DPPH (314.47 μM), λίγο πριν χρησιμοποιηθεί για τις μετρήσεις, το οποίο παρέμεινε σε σκουρόχρωμο περιέκτη σε θερμοκρασία δωματίου. Στην μικροπλάκα 96 κελιών τοποθετήθηκαν 10 μL δείγματος και 190 μL διαλύματος DPPH. Στο διάλυμα αρνητικού ελέγχου (negative control) χρησιμοποιήθηκε ο διαλύτης των δειγμάτων (στη συγκεκριμένη περίπτωση DMSO) αντί του δείγματος (η απορρόφηση αυτού του διαλύματος είναι 1.780±0.025) ενώ χρησιμοποιήθηκε αιθανόλη αντί του αντιδραστηρίου για τη μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων απουσία DPPH (blank). Ακολούθησε επώαση διάρκειας 30 λεπτών σε σκοτεινό περιβάλλον και θερμοκρασία δωματίου και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 517 nm. Το ποσοστό εξουδετέρωσης ελεύθερης ρίζας (%) υπολογίστηκε βάσει του παρακάτω τύπου:

$$I\% = \left[\frac{A_0 - A}{A_0} \right] * 100$$

όπου A₀: η απορρόφηση του διαλύματος αρνητικού ελέγχου και A: η απορρόφηση του δείγματος παρουσία DPPH

Τα εκχυλίσματα αξιολογήθηκαν σε συγκέντρωση 4 mg/mL (σε DMSO) (τελική συγκέντρωση 200 μg/mL). Κάθε μέτρηση επαναλήφθηκε τρεις φορές. Ως πρότυπος αντιοξειδωτικός παράγοντας χρησιμοποιήθηκε το γαλλικό οξύ (IC₅₀=5 μg/ml)¹⁵¹.

➤ Αξιολόγηση κυτταροτοξικής δράσης

Η αξιολόγηση της κυτταροτοξικής δράσης των ολικών εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε στο επιστημονικό ίδρυμα Fundación MEDINA της Ισπανίας στις κυτταρικές καρκινικές σειρές

A2058 (κύτταρα ανθρώπινου μελανώματος), MCF-7 (ανθρώπινα κύτταρα αδenoκαρκινώματος μαστού) και HepG2 (ανθρώπινα ηπατικά καρκινικά κύτταρα) με τη μέθοδο MTT. Επίσης ελέγχθηκε η κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων σε φυσιολογική σειρά ανθρώπινων ινοβλαστών CCD-25Sk (ATCC CRL-1474) με τη δοκιμασία HOECHST, μια χρωματομετρική μέθοδο αξιολόγησης της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων. Τα εκχυλίσματα μελετήθηκαν με τη μορφή διαλύματος σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) συγκέντρωσης 250 µg/mL και μετρήθηκε το ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων.

Μέθοδος MTT

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) αποτελεί μια χρωματομετρική δοκιμασία που επιτρέπει τη μέτρηση της μιτοχονδριακής μεταβολικής δραστηριότητας και συγκεκριμένα των κυτταρικών ενζύμων τα οποία προκαλούν αναγωγή των αλάτων του τετραζολίου σε μη διάλυτα σύμπλοκα φορμαζάνης, μωβ χρώματος. Το MTT είναι υδατοδιαλυτό άλας τετραζολίου κίτρινου χρώματος που ανάγεται από τις αφυδρογονάσεις των μιτοχονδρίων των ζωντανών κυττάρων και δίνει αδιάλυτους πορφυρού-μωβ χρώματος κρυστάλλους φορμαζάνης, οι οποίοι συσσωρεύονται στα μιτοχόνδρια του κυττάρου. Η αναγωγή 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 DMSO και το χρώμα που παράγεται υπολογίζεται φασματοφωτομετρικά στα 570 nm¹⁵².

Τα κύτταρα HepG2 (HB-8065) αποτελούν μια συνεχή κυτταρική σειρά η οποία προέρχεται από το ήπαρ Αμερικανού Καυκάσιου άντρα 15 ετών με καλώς διαφοροποιημένο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Αυτά τα κύτταρα είναι επιθηλιακά στη μορφολογία. Τα κύτταρα δέρματος A2058 (ATCC CRL-11147) προέρχονται από μελάνωμα ενός Καυκάσιου Αμερικανού άντρα 43 ετών. Τα κύτταρα MCF-7 (ATCC) προέρχονται από αδenoκαρκίνωμα στήθους γυναίκας, Καυκάσιας, 69 ετών.

Πειραματική πορεία

Είκοσι χιλιάδες κύτταρα ανά κελί (για δοκιμασία 24 ωρών) και δέκα χιλιάδες κύτταρα ανά κελί (για δοκιμασία 72 ωρών) τοποθετήθηκαν σε 200 µL μέσου καλλιέργειας στα κελιά μικροπλάκας με τη βοήθεια ενός ρομποτικού συστήματος κυτταρικής καλλιέργειας, SelecT (TAP Biosystems, Royston, UK). Μετά από 24 ώρες επώασης στους 37°C με 5% CO₂ το μέσο

καλλιέργειας αντικαταστάθηκε με τελικό όγκο 195 μL και 5 μL δείγματος (αραίωση 1/40) ενώ μάρτυρες (controls) υπήρχαν σε όλες τις πλάκες. Τα δείγματα και οι μάρτυρες τοποθετήθηκαν με ένα σύστημα αυτόματου χειρισμού υγρών, Biomek FX (Beckman Coulter, Pasadena, CA, USA). Ως θετικός μάρτυρας (positive control) χρησιμοποιήθηκε ο μεθανοσουλφικός μεθυλεστέρας (methyl methanesulfonate (MMS)) σε συγκέντρωση 8 mM και ως αρνητικός μάρτυρας (negative control) το DMSO 0.2%. Προηγουμένως είχαν κατασκευαστεί καμπύλες δόσης – απόκρισης του DMSO για κάθε κυτταρική σειρά που ελέγχθηκε και καμία επίδραση δεν παρατηρήθηκε για ποσοστά DMSO έως 1%. Ως πρότυπη ουσία (internal control) χρησιμοποιήθηκε η δοξορουβικίνη. Όταν τα εκχυλίσματα και οι μάρτυρες (controls) προστέθηκαν, οι μικροπλάκες επώαστηκαν στους 37°C με 5% CO₂ σε ειδικό επωαστήρα για 24 και 72 ώρες. Το κάθε δείγμα εξετάστηκε εις διπλούν σε μια συγκέντρωση. Ακολούθως το διάλυμα του MTT προετοιμάστηκε σε συγκέντρωση 5 mg/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 1X και στη συνέχεια αραιώθηκε στα 0.5 mg/mL σε MEM απαλλαγμένο από ερυθρό της φαινόλης. Το διάλυμα του δείγματος αφαιρέθηκε και 100 μL MTT αντιδραστηρίου προστέθηκαν σε κάθε κελί. Οι μικροπλάκες ανακινήθηκαν ελαφρώς και επώαστηκαν για 3 ώρες στους 37°C σε ρυθμισμένο επωαστήρα με 5% CO₂. Το υπερκείμενο υγρό απομακρύνθηκε και 100 μL DMSO 100% προστέθηκαν. Οι μικροπλάκες ανακινήθηκαν ελαφρώς προκειμένου να διαλυθούν οι παραγόμενοι κρύσταλλοι φορμαζάνης και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 570 nm μέσω ενός φωτομέτρου (multireader) Victor™ Wallac (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

Μέθοδος HOECHST

Αρχή μεθόδου

Η φθορίζουσα χρωστική Hoechst (2'-[4-ethoxyphenyl]-5-[4-methyl-1-piperazinyl]-2,5'-bi-1H-benzimidazole trihydrochloride trihydrate) έχει την ικανότητα να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση των αποπτωτικών κυττάρων από τα ζωντανά μέσα στον κυτταρικό κύκλο, σε αντίθεση με άλλους φθορίζοντες ανιχνευτές όπου τα κύτταρα θα πρέπει πρώτα να είναι μονιμοποιημένα ή διαπερατά. Η χρωστική αυτή χρησιμοποιείται για την οπτικοποίηση των μεταβολών που εντοπίζονται στον πυρήνα του κυττάρου και συγκεκριμένα της χαρακτηριστικής διαμόρφωσης του αποπτωτικού κυτταρικού σώματος κατά την οποία συμβαίνει συρρίκνωση του κυττάρου, θραυσματοποίηση του πυρήνα και συμπύκνωση της χρωματίνης με την οποία μπορεί να συνδέεται¹⁵³. Έτσι, τα κύτταρα που φέρουν έντονο μπλε φθορισμό μετά από κατεργασία με την Hoechst 3342 παρουσιάζουν τα τυπικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης.

Τα κύτταρα CCD-25Sk (ATCC CRL-1474) είναι ινοβλάστες και έχουν την ικανότητα να προσκολλώνται στον πυθμένα. Η σειρά έχει προέλθει από υγιές δέρμα αθηνούς.

Πειραματική πορεία

Είκοσι χιλιάδες κύτταρα ανά κελί (για δοκιμασία 24 ωρών) και δέκα χιλιάδες κύτταρα ανά κελί (για δοκιμασία 72 ωρών) τοποθετήθηκαν σε 200 μ L μέσου καλλιέργειας στα κελιά μικροπλάκας με τη βοήθεια ενός ρομποτικού συστήματος κυτταρικής καλλιέργειας, Select (TAP Biosystems, Royston, UK). Μετά από 24 ώρες επώασης στους 37°C με 5% CO₂, το μέσο καλλιέργειας αντικαταστάθηκε από 195 μ L και 5 μ L δείγματος (αραίωση 1/40) ενώ μάρτυρες υπήρχαν σε όλες τις μικροπλάκες. Ως θετικός μάρτυρας (positive control) χρησιμοποιήθηκε ο μεθανοσουλφικός μεθυλεστέρας (methyl methanesulfonate (MMS)) σε συγκέντρωση 8 mM και ως αρνητικός μάρτυρας (negative control) το DMSO 0.2%. Μέσω κατασκευής καμπύλης δόσης – απόκρισης του DMSO για τη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά έγινε δυνατός ο υπολογισμός της μέγιστης περιεκτικότητας 1% του DMSO που δεν προκαλεί καμία επίδραση. Ως πρότυπη ουσία (internal control) χρησιμοποιήθηκε η δοξορουβικίνη. Όταν τα εκχυλίσματα και οι μάρτυρες προστέθηκαν, η μικροπλάκα επώαστηκε στους 37°C με 5% CO₂ για 24 και 72 ώρες. Η μπλε φθορίζουσα χρωστική Hoechst 33342 που χρησιμοποιήθηκε, έχει την ιδιότητα να συνδέεται και να ανιχνεύει το DNA των αποπτωτικών κυττάρων ιδιαίτερα σε περιοχές όπου εντοπίζεται η αλληλουχία αδενίνης - θυμίνης. Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με μέσο απαλλαγμένο από φυσιολογικό ορό και επώαστηκαν με τη χρωστική (1 μ L/mL στο μέσο) για 30 λεπτά στον πάγο. Η ένταση του φθορισμού των δειγμάτων μετρήθηκε στο όργανο HCS Pathway_855 στα 350 nm, μήκος κύματος ακτινοβολίας διέγερσης και στα 461 nm, μήκος κύματος ακτινοβολίας εκπομπής. Το κάθε δείγμα εξετάστηκε εις διπλούν σε μια συγκέντρωση.

➤ Αξιολόγηση ικανότητας ενζυμικής αναστολής

Για την αξιολόγηση της *αντιοφικής δράσης* των εκχυλισμάτων, των κλασμάτων και των ουσιών που προέκυψαν από αυτά, αναπτύχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις χρωματομετρικές μέθοδοι μέτρησης ενζυμικής αναστολής¹⁵⁴. Αυτές είναι: ικανότητα αναστολής ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) (2 τρόποι μέτρησης), υαλουρονιδάσης (Hyal) και εκκρινόμενης φωσφολιπάσης A₂ (sPLA₂). Τα συγκεκριμένα ένζυμα περιέχονται στο δηλητήριο των φιδιών όπως έχει ήδη αναφερθεί^{155 156 157}. Τα ίδια ένζυμα όμως εμπλέκονται και σε άλλες παθοφυσιολογικές καταστάσεις όπως για παράδειγμα η AChE σε νευροεκφυλιστικές νόσους π.χ. νόσος Alzheimer^{158 159}, η sPLA₂ στη φλεγμονή και στον πόνο^{123 160} και η υαλουρονιδάση στη διαδικασία της

επούλωσης¹⁰⁰. Συνεπώς παράγοντες αναστολής τους εμφανίζουν μεγάλο φαρμακολογικό ενδιαφέρον.

Τα πρωτόκολλα των βιοδοκιμών που αναπτύχθηκαν και εν συνεχεία εφαρμόστηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας περιγράφονται παρακάτω.

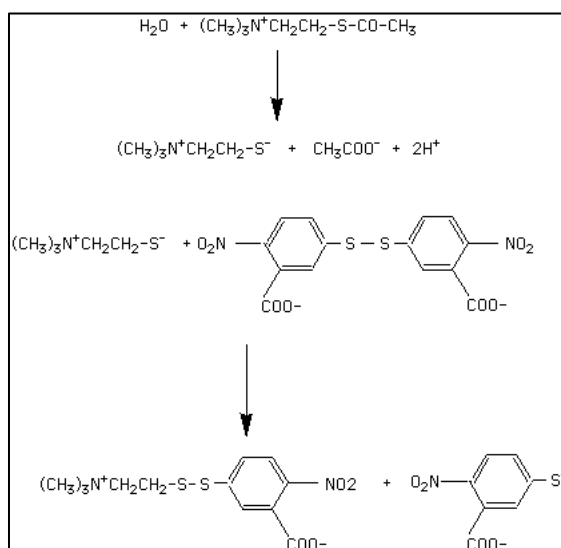
In vitro έλεγχος ικανότητας αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης

(Μέθοδος Ellman's)

Αρχή μεθόδου

Η πρώτη μέθοδος που εφαρμόστηκε για την αξιολόγηση δειγμάτων ως προς την ικανότητα αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) έχει περιγραφεί από τους Ellman *et al.* (1961)¹⁶¹ και τους Hasnat *et al.* (2013)¹⁶², όπου πραγματοποιήθηκαν μικρές τροποποιήσεις για τη βελτίωση της ευαισθησίας της δοκιμασίας.

Το ένζυμο της AChE υδρολύει το υπόστρωμα της ιωδιούχου ακετυλοθειοχολίνης (acetylthiocholine iodide, ATCI) σε θειοχολίνη και οξικό οξύ. Η θειοχολίνη εν συνεχεία αντιδρά με το 5,5'-διθειο-δις-(2-νιτροβενζοϊκό ανιόν) (DTNB) με αποτέλεσμα τη δημιουργία κίτρινου ανιόντος 5-θειο-2-νιτροβενζοϊκού οξέος. Η απορρόφηση του παραγόμενου έγχρωμου προϊόντος μετράται στα 410 nm και είναι ενδεικτική του ρυθμού παραγωγής της θειόλης και συνεπώς της ενζυμικής δραστηριότητας.



Εικόνα 64. Σχηματική αναπαράσταση μεθόδου Ellman's για τον προσδιορισμό ικανότητας αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης

Πειραματική πορεία

Παρασκευάστηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

- ❖ *Ρυθμιστικό διάλυμα (PBS) φωσφορικών αλάτων (NaH₂PO₄, Na₂HPO₄) 0.1 M με τιμή pH 8.0*

Έχει δοκιμαστεί και το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 20 mM με τιμή pH 7.5, αλλά στην σε αυτήν την περίπτωση μειώθηκε η τιμή απορρόφησης του πειράματος θετικού ελέγχου (positive control).

- ❖ *Διάλυμα ενζύμου, ακετυλοχολινεστεράσης (Acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus* (electric eel), AChE), 0.1 U/mL στο ρυθμιστικό διάλυμα της μεθόδου*

Έχει δοκιμαστεί και η διπλάσια συγκέντρωση του ενζύμου, ενώ έχει ελεγχθεί η σταθερότητα του διαλύματος του ενζύμου το οποίο θα πρέπει να χρησιμοποιείται άμεσα (εντός μίας ώρας) καθώς εύκολα χάνει την ενεργότητά του. Το ένζυμο φυλάσσεται υπό τη μορφή πυκνού διαλύματος (100 U/mL) μοιρασμένου σε μικρούς όγκους (aliquots των 10 μ L) στους -20 °C και διατηρείται αναλλοίωτο για διάστημα ενός έτους.

- ❖ *Διάλυμα υποστρώματος, ακετυλοθειοχολίνης (ATCI), 14 mM σε ρυθμιστικό διάλυμα της μεθόδου*
- ❖ *Διάλυμα χρωμογόνου αντιδραστήριου 5,5'-διθειο-δισ-(2-νιτροβενζοϊκού οξέος) (DTNB) 10 mM σε ρυθμιστικό διάλυμα της μεθόδου με 50% μεθανόλη*

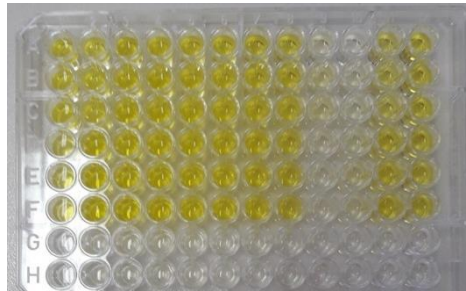
Άλλοι παράγοντες της ενζυμικής αντίδρασης οι οποίοι εξετάστηκαν ήταν η θερμοκρασία (πραγματοποίηση πειραμάτων στους 25°C και 37°C) και ο χρόνος (παρακολούθηση κινητικής της αντίδρασης) τόσο στο σημείο επώασης του δείγματος με το ένζυμο όσο και κατόπιν της ανάμειξης όλων των αντιδραστηρίων. Ακόμη αξιολογήθηκε η επίδραση του διαλύτη DMSO (διαλύματα δειγμάτων) σε συγκεντρώσεις 5%, 3%, 2% και 1% όπου επιλέχθηκε η τελευταία ως ανεκτή περιεκτικότητα DMSO στο τελικό διάλυμα της αντίδρασης.

Ως καλύτερη πειραματική πορεία ελέγχου πιθανών αναστολέων της AChE, με βάση την ευαισθησία, την επαναληψιμότητα, τη διάρκεια και το κόστος, επιλέχθηκε η εξής: σε μικροπλάκα 96 κελιών προστίθενται 150 μ L ρυθμιστικού διαλύματος 0.1 M PBS pH 8.0, 10 μ L δείγματος (έως 1% DMSO) και 20 μ L AChE (0.1 U/mL). Το μείγμα επωάζεται για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου

αποφεύγοντας την έκθεσή του στο φως. Ακολουθεί η προσθήκη 10 μL αντιδραστηρίου DTNB (10 mM) και 10 μL υποστρώματος ATCl (14 mM). Κατόπιν επώασης διάρκειας 10 min, σε θερμοκρασία δωματίου και σκότος, μετράται η απορρόφηση του μείγματος στα 410 nm. Θετικό μάρτυρα (positive control) αποτελεί το 1% DMSO (100% ενζυμικής δραστηριότητας). Επίσης μετράται η τιμή της απορρόφησης του υποψήφιου αναστολέα απουσία ενζύμου (blank, background well) η οποία αφαιρείται από την τιμή της απορρόφησης του μείγματος αντίδρασης ενζύμου, υποστρώματος, υποψήφιου αναστολέα. Το ποσοστό αναστολής της AChE, I(%), υπολογίζεται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$I\% = \left[\frac{A_0 - A}{A_0} \right] * 100$$

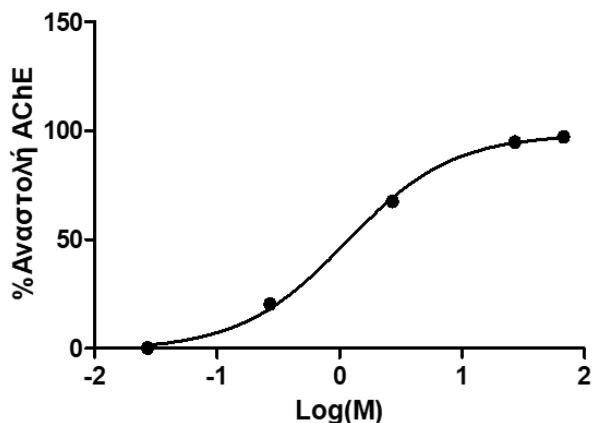
όπου A_0 : η απορρόφηση του διαλύματος θετικού ελέγχου και A : η απορρόφηση του υποψήφιου αναστολέα.



Εικόνα 65. Μικροπλάκα 96 κελιών όπου πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία Ellman's

Τα εκχυλίσματα αξιολογήθηκαν σε τελική συγκέντρωση 300 μg/mL, τα κλάσματα στα 75 μg/mL και οι καθαρές ουσίες σε διάφορες συγκεντρώσεις. Κάθε μέτρηση επαναλήφθηκε τρεις φορές. Ως πρότυπος αναστολέας χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά η γαλανταμίνη. Κατασκευάστηκε η καμπύλη της πρότυπης ουσίας (συγκεντρώσεις 67.5 μM, 27 μM, 2.7 μM, 0.27 μM και 0.027 μM) και υπολογίστηκε η τιμή IC_{50} στα 1.4 μM.

Γαλανταμίνη



Εικόνα 66. Καμπύλη συσχέτισης συγκέντρωσης - δράσης για την ουσία γαλανταμίνη (Ellman's)

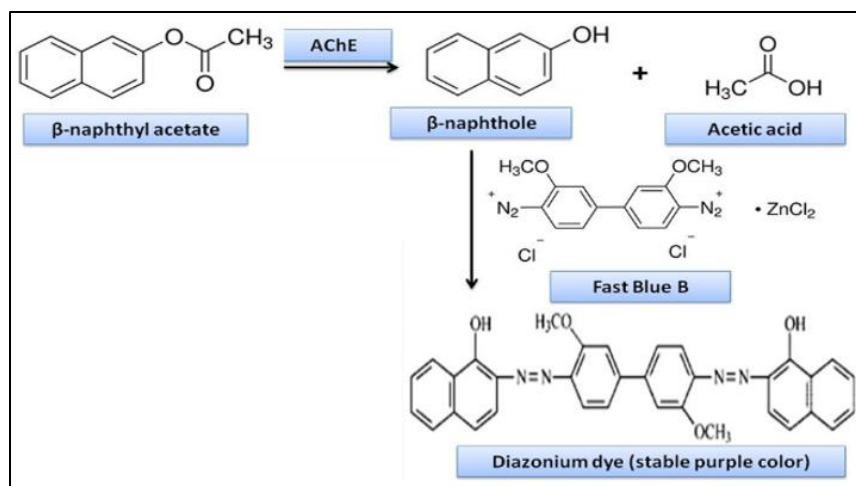
In vitro έλεγχος ικανότητας αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης

(Μέθοδος NA-FBB)

Αρχή μεθόδου

Το δεύτερο πρωτόκολλο αξιολόγησης δειγμάτων ως προς την ικανότητα αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης που αναπτύχθηκε και ακολουθήθηκε είναι αυτό που περιγράφεται από τους Ali-Shtayeh *et al.* (2014)¹⁶³ με μικρές τροποποιήσεις.

Συγκεκριμένα γίνεται μέτρηση της απορρόφησης στα 600 nm του διαζωνικού άλατος το οποίο φέρει έντονο μωβ χρώμα και σχηματίζεται από την αντίδραση μιας β-ναφθόλης και του χρωμογόνου αντιδραστηρίου fast blue B (FBB). Η β-ναφθόλη αποτελεί προϊόν υδρόλυσης του υποστρώματος της ακετοξυ-β-ναφθόλης (β-naphthyl acetate, NA) από την ακετυλοχολινεστεράση. Η μείωση της έντασης της απορρόφησης (αποχρωματισμός) υπό την επιδραση ενός δείγματος αποτελεί ένδειξη αναστολής της ενζυμικής δραστηριότητας. Η πορεία αποδίδεται σχηματικά παρακάτω:



Εικόνα 67. Σχηματική αναπαράσταση μεθόδου NA-FBB για τον προσδιορισμό ικανότητας αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης

Πειραματική πορεία

Παρασκευάστηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

- ❖ Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS-HCl (τρομεθαμίνης) 20 mM με τιμή pH 7.5

Έχει δοκιμαστεί και το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 50 mM με τιμή pH 8.0 στο οποίο υπήρχαν προβλήματα διαλυτότητας του ενζύμου.

- ❖ Διάλυμα ενζύμου, ακετυλοχολινεστεράσης (Acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus* (electric eel), AChE), 6.66 U/mL στο ρυθμιστικό διάλυμα της μεθόδου

Έχει δοκιμαστεί και η συγκέντρωση 3.33 U/mL του ενζύμου η οποία δεν αρκούσε για την ανίχνευση ικανοποιητικής απορρόφησης της ενζυμικής αντίδρασης (positive control). Επίσης, έχει ελεγχθεί η σταθερότητα του διαλύματος εργασίας του ενζύμου το οποίο θα πρέπει να χρησιμοποιείται άμεσα (εντός μίας ώρας) καθώς εύκολα χάνει την ενεργότητά του. Το ένζυμο φυλάσσεται υπό τη μορφή πυκνού διαλύματος (100 U/mL) μοιρασμένου (aliquots) σε όγκους του 1 mL στους $-20\text{ }^\circ\text{C}$ και διατηρείται αναλλοίωτο για διάστημα ενός έτους.

- ❖ Διάλυμα υποστρώματος, ακετοξυ-β-ναφθόλης (β-NA), 0.25 mg/mL σε μεθανόλη
- ❖ Διάλυμα χρωμογόνου αντιδραστηρίου Fast Blue B (FBB) 2.5 mg/mL σε νερό

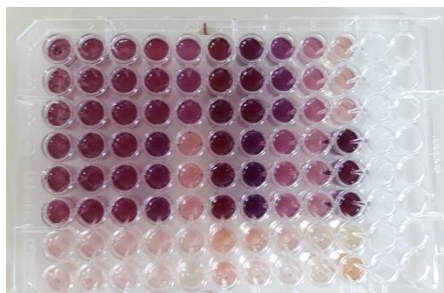
Άλλοι παράγοντες της ενζυμικής αντίδρασης οι οποίοι εξετάστηκαν ήταν η θερμοκρασία (πραγματοποίηση πειραμάτων στους 25°C και 37°C) και ο χρόνος (παρακολούθηση κινητικής της

αντίδρασης μετά την ανάμειξη όλων των αντιδραστηρίων). Ακόμη αξιολογήθηκε η επίδραση του διαλύτη DMSO (διαλύματα δειγμάτων) σε διάφορες συγκεντρώσεις και θεωρήθηκε ανεκτή η περιεκτικότητα έως 3.7%.

Ως καλύτερη πειραματική πορεία ελέγχου πιθανών αναστολέων της AChE, με βάση την ευαισθησία, την επαναληψιμότητα, τη διάρκεια και το κόστος, επιλέχθηκε η εξής: σε μικροπλάκα 96 κελιών προστίθενται 10 μL δείγματος (έως 3.7% DMSO), 50 μL υποστρώματος β -NA (0.25 mg/mL) και 200 μL AChE (6.66 U/mL). Το μείγμα επωάζεται για 40 min σε θερμοκρασία 37°C αποφεύγοντας την έκθεσή του στο φως. Ακολουθεί η προσθήκη 10 μL χρωμογόνου αντιδραστηρίου FBB (2.5 mg/mL) και μετράται η απορρόφηση του μείγματος στα 600 nm. Θετικό μάρτυρα (positive control) αποτελεί το μείγμα με 3.7% DMSO (100% ενζυμικής δραστηριότητας). Επίσης, μετράται η τιμή της απορρόφησης του υποψήφιου αναστολέα απουσία ενζύμου (blank, background well), η οποία αφαιρείται από την τιμή της απορρόφησης του μείγματος αντίδρασης ενζύμου, υποστρώματος, υποψήφιου αναστολέα. Το ποσοστό αναστολής της AChE, I(%), υπολογίζεται με βάση τον παρακάτω τύπο:

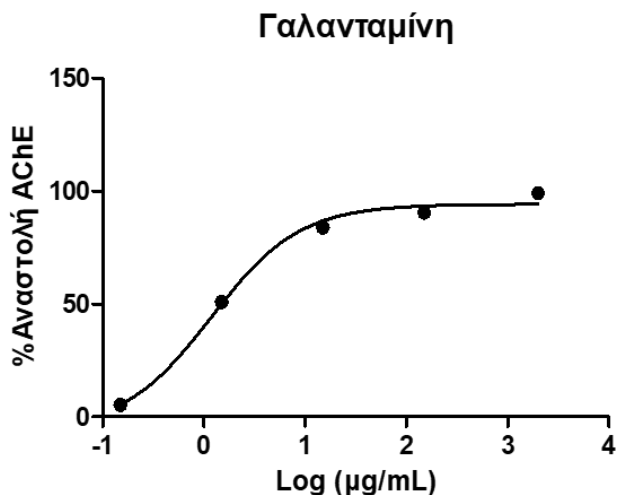
$$I\% = \left[\frac{A_0 - A}{A_0} \right] * 100$$

όπου A_0 : η απορρόφηση του διαλύματος θετικού ελέγχου και A : η απορρόφηση του υποψήφιου αναστολέα.



Εικόνα 68. Μικροπλάκα 96 κελιών όπου πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία NA-FBB

Τα εκχυλίσματα αξιολογήθηκαν σε τελική συγκέντρωση 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και οι καθαρές ουσίες σε διάφορες συγκεντρώσεις. Κάθε μέτρηση επαναλήφθηκε τρεις φορές. Ως πρότυπος αναστολέας χρησιμοποιήθηκε η ουσία γκαλανθαμίνη. Κατασκευάστηκε η καμπύλη της πρότυπης ουσίας (συγκεντρώσεις 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) και υπολογίστηκε η τιμή IC_{50} στα 1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (3.26 μM).

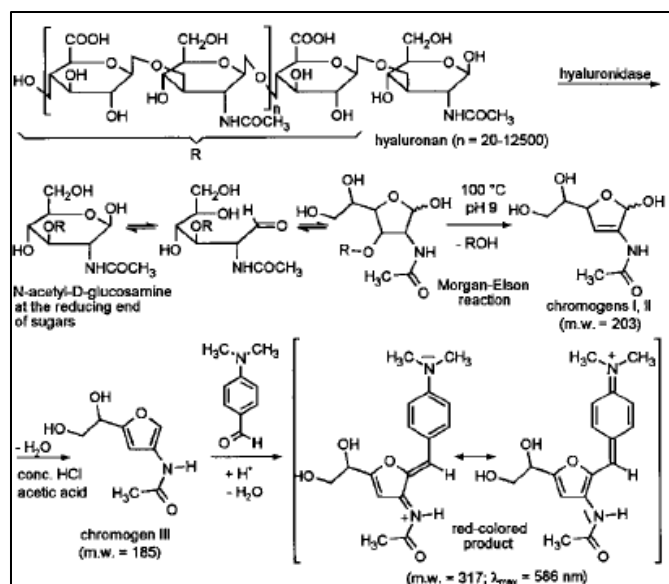


Εικόνα 69. Καμπύλη συσχέτισης συγκέντρωσης - δράσης για την ουσία γαλανταμίνη (NA-FBB)

In vitro έλεγχος ικανότητας αναστολής της υαλουρονιδάσης

Αρχή μεθόδου

Το πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε είναι αυτό το οποίο περιγράφεται από τους Algui *et al.* (2008)⁹⁷ (με μικρές τροποποιήσεις) και βασίζεται στην αντίδραση Morgan-Elson. Η υαλουρονιδάση υδρολύει το υαλουρονικό οξύ προς σχηματισμό ολιγοσακχαριτών (τετρασακχαριτών) οι οποίοι στο τέλος της αλυσίδας τους φέρουν ελεύθερη την ομάδα της *N*-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνης. Τα χρωμογόνα I (α-διαμόρφωση) και II (β-διαμόρφωση) παράγονται κάτω από αλκαλικές συνθήκες της αντίδρασης Morgan-Elson. Επακόλουθη επίδραση με μείγμα πυκού υδροχλωρικού οξέος και παγόμορφου οξικού οξέος οδηγεί στην απομάκρυνση ενός μορίου νερού και στο σχηματισμό χρωμογόνου III (3-ακεταμιδο-5-(1,2-διϋδροξυαιθυλο)φουράνιο) της αντίδρασης Morgan-Elson. Στο τελικό βήμα της αντίδρασης, το χρωμογόνο III αντιδρά με την *π*-διμεθυλαμινοβενζαλδεΐδη (DMAB, αντιδραστήριο Ehrlich) προς το σχηματισμό ενός έγχρωμου προϊόντος μωβ χρώματος. Συγκεκριμένα πραγματοποιείται ηλεκτρονιόφιλη προσβολή από την αλδεΐδη στη θέση 2 του φουρανίου, η οποία ακολουθείται από αφυδάτωση και παραγωγή του τελικού προϊόντος μωβ χρώματος ($\lambda = 590 \text{ nm}$). Το προϊόν αυτό είναι ευαίσθητο όταν εκτίθεται στο φως και χημικά ασταθές ($t_{1/2} < 1 \text{ min}$). Η πορεία αποδίδεται σχηματικά παρακάτω:



Εικόνα 70. Σχηματική αναπαράσταση μεθόδου προσδιορισμού ικανότητας αναστολής της υαλουρονιδάσης- αντίδραση Morgan Elson

Πειραματική πορεία

Παρασκευάστηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

- ❖ Ρυθμιστικό διάλυμα φορμικού νατρίου (HCOONa) 0.1 M με χλωριούχο νάτριο (NaCl) 0.1 M και τιμή pH 3.5 (διόρθωση pH με φορμικό οξύ)

Έχει δοκιμαστεί και το ρυθμιστικό διάλυμα φορμικού νατρίου (HCOONa) 0.2 M με χλωριούχο νάτριο (NaCl) 0.1 M και τιμή pH 3.5.

- ❖ Διάλυμα ενζύμου, υαλουρονιδάσης (Hyal, Hyaluronidase from bovine testes, BTH), συγκέντρωσης 1600 U/mL στο ρυθμιστικό διάλυμα της μεθόδου. Η BTH είναι ενεργή σε τιμές pH 7.0 έως 3.0 και παρουσιάζει ομολογία περίπου 65% με την ανθρώπινη PH-20 και 40% με την ανθρώπινη όξινη Hyal-1¹⁶⁴.

Έχουν δοκιμαστεί και οι συγκεντρώσεις 800 U/mL, 1000 U/mL, 1200 U/mL, 1400 U/mL, 1800 U/mL, 2000 U/mL, 2400 U/mL, 3200 U/mL, 4000 U/mL, 5600 U/mL, 6000 U/mL, 6400 U/mL και 8000 U/mL μέχρι να επιλεγεί η καταλληλότερη. Επίσης, έχει ελεγχθεί η σταθερότητα του διαλύματος εργασίας του ενζύμου το οποίο θα πρέπει να χρησιμοποιείται άμεσα (εντός μίας ώρας) καθώς εύκολα χάνει την ενεργότητά του. Το ένζυμο δεν φυλάσσεται υπό τη μορφή πυκνού

διαλύματος (aliquots) διότι καθίσταται ανενεργό. Το διάλυμα εργασίας θα πρέπει να παρασκευάζεται την ημέρα του πειράματος.

- ❖ *Διάλυμα αλβουμίνης βοείου ορού (BSA) συγκέντρωσης 0.5 mg/mL στο νερό*

Έχουν δοκιμαστεί και οι συγκεντρώσεις 0.2 mg/mL, 0.7 mg/mL και 1 mg/mL. Υψηλές συγκεντρώσεις BSA αυξάνουν την ένταση της απορρόφησης του positive control αλλά δυσκολεύουν την ανίχνευση της ικανότητας αναστολής μιας ουσίας.

- ❖ *Διάλυμα υποστρώματος, υαλουρονικού οξέος (Hyaluronic acid sodium salt from rooster comb), συγκέντρωσης 2.5 mg/mL σε νερό*

Έχει δοκιμαστεί και διαφορετικής προέλευσης υαλουρονικό οξύ (Hyaluronic acid sodium salt from bovine vitreous humor), αλλά λόγω υψηλού κόστους απορρίφθηκε. Επιπλέον, συγκεντρώσεις υποστρώματος που ελέγχθηκαν είναι 0.4 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.6 mg/mL, 0.7 mg/mL, 0.8 mg/mL, 1 mg/mL και 3 mg/mL μέχρι να επιλεγεί η καταλληλότερη.

- ❖ *Αλκαλικό διάλυμα διακοπής αντίδρασης βορικού οξέος και καυστικού καλίου pH 9.0*

Παρασκευάζεται με διάλυση 4.94 g βορικού οξέος (Boric acid) και 1.98 g καυστικού καλίου (KOH) σε 100 mL νερό. Η προσθήκη διαλύματος 0.8 g/mL (σε νερό) ανθρακικού καλίου (K_2CO_3) σε αναλογία 10:1 (διάλυμα βορικού οξέος : διάλυμα ανθρακικού καλίου) ενίσχυσε την ένταση της απορρόφησης της ενζυμικής αντίδρασης (positive control)¹⁶⁵.

- ❖ *Διάλυμα χρωμογόνου αντιδραστήριου, π-διμεθυλαμινοβενζαλδεΐδης (DMAB)*

Παρασκευάζεται με διάλυση 5 g π-διμεθυλαμινοβενζαλδεΐδης (DMAB) σε 6.25 mL πυκνού υδροχλωρικού οξέος (HCl) και 43.75 mL παγόμορφου οξικού οξέος (CH_3COOH). Το διάλυμα αραιώνεται 9 φορές με παγόμορφο οξικό οξύ πριν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του προϊόντος της αντίδρασης.

Άλλοι παράγοντες της ενζυμικής αντίδρασης οι οποίοι εξετάστηκαν ήταν η θερμοκρασία (πραγματοποίηση πειραμάτων στους 25°C και 37°C) και ο χρόνος σε όλα τα στάδια της μεθόδου, όπου παρατηρήθηκε ότι επώαση ενζύμου – υποψήφιου αναστολέα μεγαλύτερη των 20 min οδηγεί σε χαμηλή τιμή απορρόφησης positive control. Επίσης, από την παρακολούθηση της

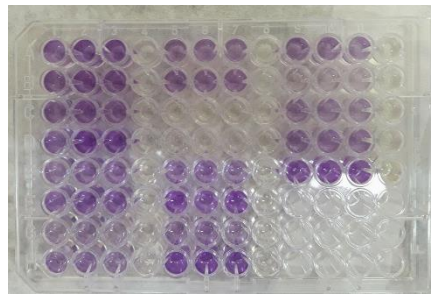
κινητικής της αντίδρασης προέκυψε ότι επώαση χρωμογόνου – δείγματος μεγαλύτερη των 20 min οδηγεί σε χαμηλή τιμή απορρόφησης positive control, ενώ αξιολογήθηκε και η διάρκεια επίδρασης αλκαλικού διαλύματος επί του δείγματος προκειμένου να προσδιοριστεί ο καταλληλότερος χρόνος διακοπής της αντίδρασης. Ακόμη αξιολογήθηκε η επίδραση του διαλύτη DMSO (διαλύματα δειγμάτων) σε διάφορες συγκεντρώσεις και θεωρήθηκε ανεκτή η περιεκτικότητα έως 4%. Επίσης εξετάστηκαν και εντοπίστηκαν οι κατάλληλες αναλογίες αλκαλικού διαλύματος διακοπής της αντίδρασης και διαλύματος χρωμογόνου αντιδραστήριου με το δείγμα.

Μετά από μεγάλο αριθμό δοκιμασιών, ως καλύτερη πειραματική πορεία ελέγχου πιθανών αναστολέων της υαλουρονιδάσης, με βάση την ευαισθησία, την επαναληψιμότητα, τη διάρκεια, το κόστος και τη δυνατότητα αξιολόγησης πολλών δειγμάτων, επιλέχθηκε η εξής: ο προσδιορισμός πραγματοποιείται σε τρία στάδια: (1) επώαση ενζύμου – υποψήφιου αναστολέα, (2) επώαση ενζύμου, υποστρώματος και υποψήφιου αναστολέα σε όξινο περιβάλλον και (3) επώαση του χρωμογόνου αντιδραστήριου με το προϊόν διάσπασης του υαλουρονικού οξέος. Το στάδιο (1) περιλαμβάνει την ανάμειξη 48 μL διαλύματος υαλουρονιδάσης (1600 U/mL) με 2 μL διαλύματος υποψήφιου αναστολέα σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης όγκου 1.5 mL τύπου erpendorf και επώαση για 20 min στους 37 °C αποφεύγοντας την έκθεση στο φως. Ακολουθεί το στάδιο (2) κατά το οποίο γίνεται ανάμειξη 50 μL διαλύματος αλβουμίνης βόειου ορού (BSA) 0.5 mg/mL, 50 μL ρυθμιστικού διαλύματος φορμικού νατρίου 0.1 M/ χλωριούχου νατρίου 0.1 M (pH 3.5), 75 μL υπερκάθαρου νερού, 25 μL μείγματος ενζύμου – αναστολέα (στάδιο (1)) και 50 μL διαλύματος υαλουρονικού οξέος 2.5 mg/mL σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης όγκου 1.5 mL τύπου erpendorf. Σε ένα άλλο σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης τοποθετούνται 55 μL μείγματος σταδίου (2) και 13 μL αλκαλικού διαλύματος διακοπής της αντίδρασης. Το μείγμα θερμαίνεται σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 100 °C για 4.5 min οπότε αποφεύγεται η έναρξη της αντίδρασης και λαμβάνεται ως η τιμή 0 του χρόνου της αντίδρασης. Τα υπόλοιπα 195 μL του μείγματος σταδίου (2) επωάζονται για 1 ώρα στους 37 °C αποφεύγοντας την έκθεση στο φως. Κατόπιν ακολουθεί ανάμειξη 175 μL μείγματος σταδίου (2) που έχει επωαστεί με 40 μL αλκαλικού διαλύματος διακοπής της αντίδρασης και θέρμανση αυτών σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 100 °C για 4.5 min οπότε σταματά η αντίδραση. Τέλος πραγματοποιείται χρώση 55 μL μείγματος σταδίου (3) του οποίου έχει διακοπεί η αντίδραση και 55 μL μείγματος σταδίου (2) (τιμή 0) με 250 μL αραιωμένου χρωμογόνου αντιδραστήριου DMAB εις τριπλούν σε μικροπλάκα 96 κελιών. Τα δείγματα επωάζονται για 20 min στους 37 °C αποφεύγοντας την

έκθεση στο φως και μετράται η απορρόφηση στα 590 nm. Θετικό μάρτυρα (positive control) αποτελεί το 4% DMSO (100% ενζυμικής δραστηριότητας). Επίσης, η απορρόφηση της τιμής 0 αφαιρείται από την τιμή της απορρόφησης του μείγματος αντίδρασης ενζύμου, υποστρώματος, υποψήφιου αναστολέα. Το ποσοστό αναστολής της Hgal (I%), υπολογίζεται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$I\% = \left[\frac{A_0 - A}{A_0} \right] * 100$$

όπου A_0 : η απορρόφηση του διαλύματος θετικού ελέγχου και A : η απορρόφηση του υποψήφιου αναστολέα.



Εικόνα 71. Μικροπλάκα 96 κελιών όπου πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία αναστολής της υαλουρονιδάσης

Τα εκχυλίσματα αξιολογήθηκαν σε τελική συγκέντρωση 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, τα κλάσματα στα 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και οι καθαρές ουσίες σε διάφορες συγκεντρώσεις. Ως πρότυπος αναστολέας χρησιμοποιήθηκε το ροσμαρινικό οξύ σε συγκέντρωση 400 μM (91.80% αναστολή).

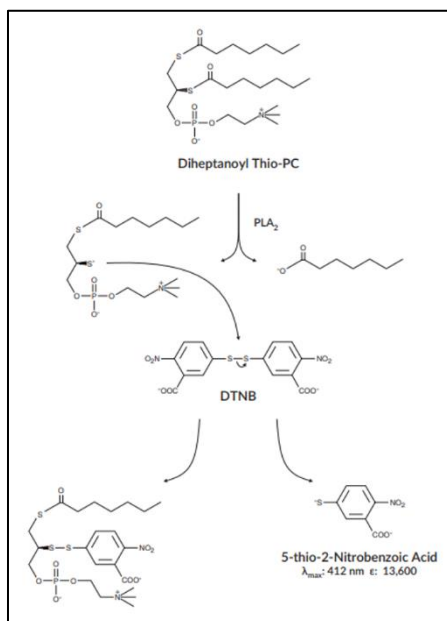
In vitro έλεγχος ικανότητας αναστολής της φωσφολιπάσης

Αρχή μεθόδου

Ο προσδιορισμός της ικανότητας αναστολής της φωσφολιπάσης πραγματοποιήθηκε για επιλεγμένα, με βάση τις βιβλιογραφικές αναφορές, εκχυλίσματα και κλάσματα. Έγινε χρήση συσκευασμένων αντιδραστηρίων (kit) που επιτρέπουν τη μέτρηση της ενεργότητας εκκρινόμενης φωσφολιπάσης A_2 (sPLA₂ Type IIA) προερχόμενης από το δηλητήριο μέλισσας. Το προϊόν (kit) αγοράστηκε από την εταιρεία Cayman με κωδικό 765001.

Συνοπτικά η πορεία μπορεί να περιγραφεί ως εξής: υπόστρωμα της sPLA₂ αποτελεί το 1,2-διθειο ανάλογο της διεπτανουλοφωσφατιδυλοχολίνης το οποίο υφίσταται υδρόλυση του θειοεστερικού δεσμού στην sn-2 θέση από το ένζυμο και ακολούθως οι ελεύθερες θειόλες που παράγονται ανιχνεύονται με τη χρήση χρωμογόνου αντιδραστηρίου, το οποίο είναι το 5,5'-διθειο-δις-(2-νιτροβενζοϊκό οξύ) (DTNB). Το 5-θειο-2-νιτροβενζοϊκό οξύ είναι το έγχρωμο προϊόν

(κίτρινο χρώμα) της αντίδρασης, του οποίου η απορρόφηση μετράται στα 414 nm. Η πορεία που περιγράφεται σχηματικά παρακάτω:



Εικόνα 72. Σχηματική αναπαράσταση μεθόδου προσδιορισμού ικανότητας αναστολής της φωσφολιπάσης

Πειραματική πορεία

Παρασκευάστηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

- ❖ Ρυθμιστικό διάλυμα 25mM Tris-HCl με τιμή pH 7.5, το οποίο εμπεριέχει 10 mM CaCl₂, 100 mM KCl και 0.3 mM Triton-X 100
- ❖ Διάλυμα υποστρώματος, 1,2-διθειο αναλόγου της διεπτανούλο-φωσφατιδυλοχολίνης (1.66mM στο ρυθμιστικό διάλυμα της μεθόδου)
- ❖ Διάλυμα ενζύμου, sPLA₂
- ❖ Διάλυμα χρωμογόνου αντιδραστηρίου DTNB 10 mM σε διάλυμα 0.4 M Tris-HCl και τιμή pH 8.0

Ο προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε σε μικροπλάκες 96 κελιών σύμφωνα με τις οδηγίες του kit ως εξής: 5 μL ρυθμιστικού διαλύματος, 5 μL δείγματος, 10 μL ενζύμου και 200 μL υποστρώματος αναμειγνύονται και επωάζονται για 15 min στους 25 °C αποφεύγοντας την έκθεση στο φως. Ακολουθεί η προσθήκη 10 μL χρωμογόνου αντιδραστηρίου DTNB και μετράται η απορρόφηση στα 414 nm. Θετικό μάρτυρα (positive control) αποτελεί το μείγμα με 2.2% DMSO (100% ενζυμικής αντίδρασης). Επίσης μετράται η τιμή της απορρόφησης του υποψήφιου

αναστολέα απουσία ενζύμου (blank, background well), η οποία αφαιρείται από την τιμή της απορρόφησης του μείγματος αντίδρασης ενζύμου, υποστρώματος, υποψήφιου αναστολέα. Το ποσοστό αναστολής της sPLA₂ (I%), υπολογίζεται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$I\% = \left[\frac{A_0 - A}{A_0} \right] * 100$$

όπου A₀: η απορρόφηση του διαλύματος θετικού ελέγχου και A: η απορρόφηση του υποψήφιου αναστολέα.

Τα εκχυλίσματα ελέγχθηκαν σε συγκέντρωση 300 µg/mL, τα κλάσματα στα 75 µg/mL και οι καθαρές ουσίες σε διάφορες συγκεντρώσεις, εις τριπλούν.

Φασματοφωτόμετρο

Όλες οι μετρήσεις για τον προσδιορισμό ικανότητας ενζυμικής αναστολής πραγματοποιήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο μικροπλακιδίων Infinite M200 PRO της Tecan με χρήση του λογισμικού Magellan™. Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με τα προγράμματα GraphPad Prism 5.0 και Microsoft Excel.



Εικόνα 73. Φασματοφωτόμετρο Tecan

Planta Medica

Greek flora as a source of new anti-oxidant, anti-elastase, anti-collagenase and anti-hyaluronidase natural agents

M Rozalia, B Vasiliki-Ioanna, D Evanthia, A Nektarios, S Alexios-Leandros

Department of Pharmacognosy and Natural Products Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Athens, Panepistimiopolis, Zografou, 15771, Athens, Greece

In order to investigate new cosmetic ingredients of natural origin, 50 plant extracts obtained from Greek flora were screened for their capacity to scavenge free radicals and inhibit enzymes related to skin ageing. Degradation of extracellular matrix (ECM) has directly been linked to skin ageing and is correlated to increase in activity of enzymes such as elastase, collagenase and hyaluronidase. Elastin, collagen and hyaluronic acid decrease, leading to a loss of strength and flexibility in skin and formation of deep wrinkles. Also free radicals induce the activity of these enzymes [1,2]. Discovery of bioactive molecules which show both anti-oxidant and anti-ageing properties is the target of the present study. Anti-elastase, anti-collagenase and anti-hyaluronidase activities of 50 methanolic and ethyl acetate extracts were determined using spectrophotometric methods. Radical scavenging activity was determined by the ability of the extracts to scavenge DPPH and ABTS radicals. The majority of the samples especially the methanolic extracts showed high anti-oxidant capacity, e.g. *Rosa damascena* extract exhibited IC50 value at 47.6 µg/ml. In anti-elastase assay 8 extracts showed more than 50% inhibition at 100 µg/ml, in anti-collagenase assay 15 extracts showed more than 60% inhibition at 100 µg/ml and in anti-hyaluronidase assay 8 extracts showed more than 80% inhibition at 300 µg/ml. The methanolic extracts of *Sedum sediforme* and *Umbilicus horizontalis* aerial parts inhibited elastase and hyaluronidase by more than 85%. *Rosa damascena* inhibited 80% of collagenase activity at 100 µg/ml. Antioxidant and enzyme inhibitory activities of the plant extracts suggest that they can restore skin elasticity and delay wrinkling process. Bioguided isolation process was performed in order to reveal the active secondary metabolites. In the case of *Rosa damascena* quercetin-3-O-rhamnoside, kaempferol-3-glucopyranoside, phenylethanol were proved to exhibit high anti-collagenase activity.

Keywords: Anti-ageing, anti-collagenase, anti-elastase, anti-hyaluronidase, anti-oxidant, Greek flora.

References:

[1]Ndlovu G, Fouche G., Tselanyane M., Cordier W., Steenkamp V. *In vitro* determination of the anti-aging potential of four southern African medicinal plants. BMC Complement Altern Med 2013; 13: 304

[2]Royer M, Prado M, Garcia-Perez ME, Diouf N, Stevanovic T. Study of nutraceutical, nutricosmetics and cosmeceutical potentials of polyphenolic bark extracts from Canadian forest species. PharmaNutrition 2013; 1: 158 – 167

7.11 Μελέτη ετεροδιακύμανσης φασματοσκοπικών δεδομένων και βιοδραστηκότητας (HetCA)

Τα τελευταία χρόνια, η ανάπτυξη της στατιστικής φασματοσκοπίας και η συνεχής βελτίωση και επέκταση των εργαλείων της αυξάνουν σημαντικά τη χρησιμότητά της στις μελέτες μεταβολομικής ως εργαλείο ταυτοποίησης και αναγνώρισης μεταβολιτών σε μικρό χρόνο και με μεγάλη ακρίβεια. Μέχρι στιγμής, η εφαρμογή αυτού του εργαλείου αφορούσε μελέτες μεταβολομικής σε ιστούς ή βιολογικά υγρά. Πλέον γίνεται συνδυασμός δύο σημαντικών τομέων της έρευνας, της χημείας φυσικών προϊόντων και τη μεταβολομικής, έχοντας ως σκοπό τον επιτυχή εντοπισμό μορίων χαμηλού μοριακού βάρους σε στοχευμένη ανάλυση των κλασμάτων που προέρχονται από κλασμάτωση των φυτικών εκχυλισμάτων. Με την εφαρμογή της μεθοδολογίας HetCA (Heterocovariance) και συγκεκριμένα αυτής που αξιοποιεί δεδομένα NMR, αποδείχθηκε ότι η συσχέτιση των NMR σημάτων με τη βιοδραστηκότητα δύναται να αποκαλύψει τα δομικά χαρακτηριστικά των δραστικών μεταβολιτών, οι οποίοι περιέχονται σε πολύπλοκα μείγματα των φυτικών παρασκευασμάτων.

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, η μελέτη τριών υδατοαλκοολικών εκχυλισμάτων (εκχύλισμα ριζών *Paeonia parnassica*, εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων *Paeonia parnassica* και εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων *Aristolochia hirta*) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της τεχνικής HetCA. Όπως αναφέρθηκε, τη βάση της συγκεκριμένης μεθοδολογίας αποτελεί η θεωρία ότι τα φασματοσκοπικά δεδομένα, τα οποία αντανakλούν τις διαφορές των συγκεντρώσεων των περιεχόμενων συστατικών, είναι δυνατό να συσχετιστούν στατιστικά με μετρήσιμες δοσοεξαρτώμενες ιδιότητες, όπως είναι η ικανότητα αναστολής ενζύμων, προκειμένου να αποκαλυφθούν οι βιοδραστικοί παράγοντες του εκχυλίσματος¹⁶⁶. Η μεθοδολογία αυτή έχει εφαρμοστεί για έναν αριθμό εκχυλισμάτων με έναν συγκεκριμένο τρόπο ο οποίος επικεντρώνεται μόνο στην περιοχή των δραστικών ουσιών και προσπαθεί να αποδώσει τη δομή τους χωρίς να χρειαστεί να προηγηθεί η απομόνωσή τους. Στην παρούσα εργασία έγινε χρήση του ήδη ανεπτυγμένου εργαλείου HetCA, με έναν ευρύτερο και πιο αυτοματοποιημένο τρόπο, έτσι ώστε να εφαρμοστεί σε δύο διαφορετικούς φαρμακολογικούς στόχους από τους μέχρι τώρα δοκιμασμένους, να επικυρωθεί η ακρίβεια της μεθόδου και να εξυπηρετηθούν οι ανάγκες μιας εθνοφαρμακολογικής μελέτης η οποία απαιτεί τεχνικές αξιόπιστης και ταχείας αξιολόγησης μεγάλου αριθμού εκχυλισμάτων για τον εντοπισμό των δραστικών συστατικών. Τα δομικά χαρακτηριστικά των βιοδραστικών συστατικών τα οποία μπορεί να βρίσκονται ακόμη και σε

χαμηλές συγκεντρώσεις ή να εμπεριέχονται σε μετρίως δραστικά εκχυλίσματα είναι δυνατόν να ανιχνευθούν μέσω αυτής της προσέγγισης προτού γίνει οποιαδήποτε απομόνωση.

Το λογισμικό MATLAB χρησιμοποιήθηκε για την ομαδοποίηση (bucketing) των φασματοσκοπικών δεδομένων που προέκυψαν από τα κλάσματα των υπό μελέτη εκχυλισμάτων και τη συσχέτιση αυτών με τις βιολογικές δράσεις έναντι των ενζύμων ακετυλοχολινεστεράσης και υαλουρονιδάσης, με την εφαρμογή του HetCA όπως αυτό έχει περιγραφεί¹⁶⁷. Προκειμένου να επιτευχθεί η ανάπτυξη ενός βέλτιστου διαγράμματος ροής και να γίνει δυνατή η αναγνώριση των συστατικών που είναι υπεύθυνα για τη βιοδραστικότητα του εκάστοτε εκχυλίσματος, μια αυτοματοποιημένη διαδικασία σχεδιάστηκε και ακολουθήθηκε με τη χρήση κάθε φορά φασματοσκοπικών δεδομένων ομάδων τεσσάρων διαδοχικών κλασμάτων με βήμα δύο (π.χ. συσχέτιση κλασμάτων 1-4, 3-6, 5-8 κ.ο.κ.). Αυτός ο τρόπος επεξεργασίας περιλαμβάνει τον ελάχιστο αριθμό φασμάτων που επιτρέπει μια επιτυχή και αξιόπιστη συσχέτιση με μεγάλη ακρίβεια και την πρόσληψη όσο το δυνατόν περισσότερης πληροφορίας. Με άλλα λόγια, έχοντας π.χ. 40 φάσματα 1D ¹H NMR, ο αλγόριθμος «έτρεξε» 20 φορές με βήμα 2 και σε κάθε επανάληψη υπολογιζόταν η συσχέτιση των δεδομένων NMR 4 κλασμάτων και των αντίστοιχων τιμών της δραστικότητας ώστε να γίνει δυνατή η αναγνώριση των δομικών χαρακτηριστικών των δραστικών συστατικών. Η συσχέτιση μεταξύ των NMR απεικονίσεων και των βιολογικών δράσεων παρουσιάζονται ως NMR ψευδοφάσματα. Κάθε σημείο αυτής της συσχέτισης έχει τη δυνατότητα να λαμβάνει ένα χαρακτηριστικό χρώμα - κωδικό (αποχρώσεις μπλε και κόκκινου) με βάση τις αντίστοιχες τιμές συσχέτισης. Ακολούθως εφαρμόσθηκε ο αλγόριθμος της Στατιστικής συνολικής φασματοσκοπίας συσχέτισης (Statistical Total Correlation Spectroscopy, STOCSY) με τη χρήση του εργαλείου 'Bruker Toolbox' υπό τις ίδιες συνθήκες έχοντας ως οδηγό τα ψευδοφάσματα 1D ¹H-NMR που προέκυψαν. Η STOCSY πραγματεύεται τον εντοπισμό των δομικών σχέσεων μεταξύ των φασμάτων ¹H-NMR ή ¹³C-NMR, την ανακάλυψη δομικών σχέσεων μεταξύ αναλυτικών πλατφορμών και την ταυτοποίηση μεταβολιτών. Μέσω της STOCSY λοιπόν, είναι δυνατόν να ανιχνευθούν πολλαπλές NMR κορυφές οι οποίες ανήκουν στο ίδιο μόριο με βάση τις εντάσεις πολυσυγγραμμικότητας (multicollinearity) σε ένα σύνολο φασμάτων NMR. Σε αυτήν την περίπτωση ο χρήστης επιλέγει μια κορυφή ενδιαφέροντος σε κάθε ομάδα κλασμάτων ώστε, είτε να διασταυρώσει τα δομικά χαρακτηριστικά του δραστικού μεταβολίτη είτε να ταυτοποιήσει κάποιον άλλο μεταβολίτη. Και στις δύο εφαρμογές παρατηρήθηκε ότι η επιλογή προκαθορισμένου κατώτερου ορίου συσχέτισης $r > 0.90$ θεωρείται επαρκές για τη συσχέτιση δύο κορυφών σε μια δομική ομάδα¹⁶⁸.

Πιο συγκεκριμένα, δημιουργήθηκαν διαλύματα των παραληφθέντων CPC κλασμάτων με τη χρήση 99.8% δευτεριωμένης μεθανόλης (MeOD) της εταιρείας Euriso-Tor, στην οποία υπήρχε εσωτερικό πρότυπο 0.03% τετραμεθυλο-σιλανίου (TMS). Τα πείραματα NMR διεξήχθησαν σε φασματόμετρο 600 MHz Avance III Bruker, το οποίο ήταν εξοπλισμένο με έναν 5 mm PABBI 1H/D-BB αισθητήρα αντίστροφης ανίχνευσης. Η θερμοκρασία ρυθμίστηκε μέσω ενός BVT-3000 ψηφιακού χειριστηρίου. Μια καθορισμένη λειτουργική διαδικασία ακολουθήθηκε (σταθεροποίηση της θερμοκρασίας, απόκρυψη του νερού) και τα φάσματα καταγράφηκαν με τη χρήση ακολουθιών παλμών (σημάτων) τα οποία περιλαμβάνονται στη βιβλιοθήκη καθορισμένου προγράμματος παλμών (σημάτων) της Bruker. Το λογισμικό ICONNMR στην έκδοση v. 4.2.6 build 9 for TopSpin 2.1, το οποίο ελέγχει έναν B-ACS 60-θέσεων αυτόματο δειγματολήπτη, χρησιμοποιήθηκε για μια εξ' ολοκλήρου αυτοματοποιημένη διαδικασία. Για όλα τα κλάσματα λήφθηκε το φάσμα πρωτονίου μιας διάστασης (^1H 1D spectrum (noesygppr1d)), κατόπιν προηγηθέντος κορεσμού.

Προκειμένου να γίνει δυνατή η αποτελεσματική ανίχνευση των υπεύθυνων βιοδραστικών συστατικών μέσω της προσέγγισης HetCA, η μέθοδος κλασμάτωσης του αρχικού εκχυλίσματος συνιστά ένα κρίσιμο σημείο. Είναι επιθυμητή η πραγματοποίηση μιας διακύμανσης της συγκέντρωσης των συστατικών μέσα στα παραληφθέντα κλάσματα. Αυτή η αυξομείωση είναι απαραίτητη καθώς υπάρχει εξάρτηση ανάμεσα στη βιολογική δράση και στη συγκέντρωση των περιεχόμενων βιοδραστικών δευτερογενών μεταβολιτών. Η Φυγόκεντρος Χρωματογραφία Κατανομής (CPC) είναι η μέθοδος που επιλέχθηκε για να εξυπηρετήσει το σκοπό της μεθοδολογίας HetCA λόγω των πλεονεκτημάτων που έχουν αναλυθεί εκτενώς στην αντίστοιχη ενότητα.

7.12 Διαλύτες-Αντιδραστήρια

Οι διαλύτες αιθανόλη 96% v/v, διχλωρομεθάνιο, οξικός αιθυλεστέρας, μεθανόλη προμηθεύτηκαν από την Merck KGaA, Darmstadt, ενώ το υγρό CO_2 (99.5%) από την εταιρεία AIR LIQUIDE HELLAS. Τα αντιδραστήρια 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH), Folin-Ciocalteu, AlCl_3 , οξικό νάτριο ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$), Acetylcholinesterase (AChE) from *Electrophorus electricus* (electric eel) type VI-S, lyophilized powder, 200-1000 units/mg protein, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), acetylthiocholine iodide (ATCI), Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride (Trizma-HCl), Sodium phosphate monobasic (NaH_2PO_4), Sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4), Dimethylsulfoxide (DMSO), Hyaluronidase from bovine testes Type I-S, lyophilized powder, 400-

1000 units/mg solid, 4-(Dimethylamino)benzaldehyde (DMAB), Hyaluronic acid sodium salt from rooster comb (HA), Bovine serum albumin (BSA), Sodium formate (HCOONa), Sodium chloride (NaCl), Formic acid (FA), Potassium hydroxide (KOH), Potassium carbonate (K₂CO₃), Glacial acetic acid (CH₃COOH), Hydrochloric acid solution (HCl), Galanthamine hydrobromide, Rosmarinic acid, Gallic acid και Quercetin αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich (USA). Η απόλυτη αιθανόλη (για τις χρωματομετρικές δοκιμασίες) προήλθε από την εταιρία Carlo Erba Reagents. Για τις αναλυτικές συσκευές έγινε χρήση LC-MS grade διαλυτών με τη μεθανόλη να έχει αγοραστεί από την Merck KGaA (Darmstadt), ενώ το νερό που χρησιμοποιήθηκε ήταν υπερκάθαρο (και στις βιοδοκιμές) και παραλήφθηκε μέσω της συσκευής Labconco Water Pro PS polishing station (Labconco Corporation, Kansas City, MSU).

7.13 Βιβλιογραφία

1. Heinrich, M. & Gibbons, S. Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution. *J. Pharm. Pharmacol.* 53, 425–432 (2001).
2. Holmstedt, B. Historical perspective and future of ethnopharmacology. *J. Ethnopharmacol.* 32, 7–24 (1991).
3. Elisabetsky, E. & Etkin, N. L. Ethnopharmacology: an Overview. *Encycl. Life Support Syst (EOLSS)*. I
4. Leonti, M. & Casu, L. Traditional medicines and globalization: Current and future perspectives in ethnopharmacology. *Front. Pharmacol.* 1–13 (2013).
5. Campbell, W. C. & Ōmura, S. From bacteria and plants to novel anti-parasite therapies. *Nobel Prize Press Release* 1–5 (2015).
6. Jütte, R. *et al.* Herbal medicinal products – Evidence and tradition from a historical perspective. *J. Ethnopharmacol.* 207, 220–225 (2017).
7. Σκαλτσά, Ε. *Ιστορία της φαρμακευτικής*.
8. Febris, D. *et al.* Ρωμαϊκή ή ελληνο-ρωμαϊκή περίοδος (146 μ.Χ.-395 μ.Χ.). 91–107 (2010).
9. Κουτρούμπας, Δ. *Η Φαρμακολογία του Γαληνού, Διδακτορική Διατριβή*. (ΕΚΠΑ, 2010).
10. Σκαλτσά, Ε. & Τσίτσα, Ε. *Σημειώσεις στην Ιστορία της Φαρμακευτικής*. (Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2010).
11. Μπαλογιαννης, Σ. Ι. Ο Γαληνός ως νευροεπιστήμων και νευροφιλόσοφος. 1–14 (2016).
12. Valiakos, E., Marselos, M., Sakellariadis, N., Constantinidis, T. & Skaltsa, H. Ethnopharmacological approach to the herbal medicines of the ‘Antidotes’ in Nikolaos Myrepsos’ *Dynameron*. *J. Ethnopharmacol.* 163, 68–82 (2015).

13. Τσελίκας, Α. *Τα ελληνικά γιατροσόφια. Μια περιφρονημένη κατηγορία χειρογράφων.* (1995).
14. Wilson, N. *Encyclopedia of Ancient Greece.* (2009).
15. Sienkewicz, T. J. *Ancient Greece, Volume 1.* (2007).
16. Nicander. *The poems and poetical fragments.* (1953).
17. Overduin, F. *Nicander of Colophon's Theriaca: a literary commentary.* (1977).
18. Patrinos, G. *The evolution of ancient Greek medicine as a trade and a science : Study of the sources Η εξέλιξη της αρχαιοελληνικής Ιατρικής ως επιστήμης και ως λειτουργήματος Μια έρευνα των πηγών.* (2013).
19. Prioreschi, P. *A history of Medicine, Vol. II-Greek Medicine.* (1996).
20. Britannica, E. of E. Nicander. *Encyclopaedia Britannica* (2008). at <<https://www.britannica.com/biography/Nicander>
21. Toohey, P. *Epic Lessons: an introduction to ancient didactic poetry.* (1996).
22. Gow, A. S. F., Scholfield, A. F. *Nicander of Colophon: The Poems and Poetical Fragments.* Cambridge Univ. Press (1953).
23. Scarborough, J. *Nicander 's Toxicology I : Snakes.* 19, 3–23 (1977).
24. Διοσκουρίδης. *ΠΕΡΙ ΥΛΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ Ε΄/ΑΠΑΝΤΑ 5.*
25. Johnson, J. *The Greek Herbal of Dioscorides. The American Journal of the Medical Sciences* 188, (1934).
26. Γερουλάνος, Σ. *Διοσκουρίδης και Φαρμακολογία. Καθημερινή*
27. Τσούρμα, Ν. & Κατσιαμπύρα, Γ. *Νικόλαος Αγραφιώτης.*
28. Χατζοπούλου, Β. *Δύο άγνωστα ιατρικά χειρόγραφα με έργα του Νικόλαου Βελισδονίτη.* 7–9 (2014).
29. Amui, S. F., Puga, R. D., Soares, A. M. & Giuliatti, S. *Plant-antivenom: Database of anti-venom medicinal plants. Electron. J. Biotechnol.* 14, 1–9 (2011).
30. Costa, L. G., Giordano, G. & Aschner, M. *Snake Venoms. Encycl. Neurol. Sci.* 4, 227 (2014).
31. Girish, K. S. & Kemparaju, K. *Inhibition of Naja naja venom hyaluronidase: Role in the management of poisonous bite. Life Sci.* 78, 1433–1440 (2006).
32. Wahby, A. F. *et al.* *Role of hyaluronidase inhibitors in the neutralization of toxicity of Egyptian horned viper Cerastes cerastes venom. J. Genet. Eng. Biotechnol.* 10, 213–219 (2012).
33. Kang, T. S. *et al.* *Enzymatic toxins from snake venom: Structural characterization and mechanism of catalysis. FEBS J.* 278, 4544–4576 (2011).

34. Kornalík, F. The influence of snake venom enzymes on blood coagulation. *Pharmacol. Ther.* 29, 353–405 (1985).
35. McCue, M. Enzyme activities and biological functions of snake venoms. *Appl. Herpetol.* 2, 109–123 (2005).
36. Calvete, J. J., Sanz, L., Angulo, Y., Lomonte, B. & Gutiérrez, J. M. Venoms, venomics, antivenomics. *FEBS Lett.* 583, 1736–1743 (2009).
37. Warrell, D. A. Snake bite. *Lancet* 375, 77–88 (2010).
38. Reichl, F.-X. *Γενική Τοξικολογία Ουσίες, Δράσεις, Περιβάλλον.* (2004).
39. Chippaux, J. P. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 23, 1–2 (2017).
40. Κουτσελίνης, Α. *Τοξικολογία Τόμος Β.* (2004).
41. Kuhn-Nentwig, L., Stöcklin, R. & Nentwig, W. *Venom composition and strategies in spiders. is everything possible? Advances in Insect Physiology* 40, (2011).
42. Guimaraes, C. *et al.* Biodiversity as a Source of Bioactive Compounds Against Snakebites. *Curr. Med. Chem.* 21, 2952–2979 (2014).
43. Houghton, P. J. & Osibogun, I. M. Flowering plants used against snakebite. *J. Ethnopharmacol.* 39, 1–29 (1993).
44. Bhattacharjee, P. & Bhattacharyya, D. Medicinal plants as snake venom antidotes. 1, 156–181 (2013).
45. Tan, N. H. *et al.* The protective effect of *Mucuna pruriens* seeds against snake venom poisoning. *J. Ethnopharmacol.* 123, 356–358 (2009).
46. Scir, A. *et al.* The belonging of gpMuc, a glycoprotein from *Mucuna pruriens* seeds, to the Kunitz-type trypsin inhibitor family explains its direct anti-snake venom activity. *Phytomedicine* 18, 887–895 (2011).
47. Ticli, F. K. *et al.* Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A2 inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): Antiserum action potentiation and molecular interaction. *Toxicon* 46, 318–327 (2005).
48. Abubakar, M. S. *et al.* In vitro snake venom detoxifying action of the leaf extract of *Guiera senegalensis*. *J. Ethnopharmacol.* 69, 253–257 (2000).
49. Fu, R. *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory activities of the phenolic extracts of *Sapium sebiferum* (L.) Roxb. leaves. *J. Ethnopharmacol.* 147, 517–524 (2013).
50. Girish, K. S., Mohanakumari, H. P., Nagaraju, S., Vishwanath, B. S. & Kemparaju, K. Hyaluronidase and protease activities from Indian snake venoms: Neutralization by *Mimosa pudica* root extract. *Fitoterapia* 75, 378–380 (2004).

51. Vishwanath, B. S., Fawzy, A. A. & Franson, R. C. Edema-inducing activity of phospholipase A2 purified from human synovial fluid and inhibition by aristolochic acid. *Inflammation* 12, 549–561 (1988).
52. Sannanaik Vishwanath, B., Manjunatha Kini, R. & Veerabasappa Gowda, T. Characterization of three edema-inducing phospholipase A2 enzymes from habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom and their interaction with the alkaloid aristolochic acid. *Toxicon* 25, 501–515 (1987).
53. Da Silva, J., Fernandes, R. & Ticli, F. K. Triterpenoid saponins, new metalloprotease snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra macroloba*. *Toxicon* 50, 283–91 (2007).
54. Chatterjee, I., Chakravarty, A. K. & Gomes, A. *Daboia russellii* and *Naja kaouthia* venom neutralization by lupeol acetate isolated from the root extract of Indian sarsaparilla *Hemidesmus indicus* R.Br. *J. Ethnopharmacol.* 106, 38–43 (2006).
55. Singh, P. *et al.* A Review on Venom Enzymes Neutralizing Ability of Secondary Metabolites from Medicinal Plants. *J. Pharmacopuncture* 20, 173–178 (2017).
56. Hutt, M. J. & Houghton, P. J. Review article: A survey from the literature of plants used to treat scorpion stings. *J. Ethnopharmacol.* 60, 97–110 (1998).
57. Uawonggul, N. *et al.* Screening of plants acting against *Heterometrus laoticus* scorpion venom activity on fibroblast cell lysis. *J. Ethnopharmacol.* 103, 201–207 (2006).
58. Nadembega, P., Boussim, J. I., Nikiema, J. B., Poli, F. & Antognoni, F. Medicinal plants in Baskoure, Kourittenga Province, Burkina Faso: An ethnobotanical study. *J. Ethnopharmacol.* 133, 378–95 (2011)
59. Pandikumar, P., Chellappandian, M., Mutheeswaran, S. & Ignacimuthu, S. Consensus of local knowledge on medicinal plants among traditional healers in Mayiladumparai block of Theni District, Tamil Nadu, India. *J. Ethnopharmacol.* 134, 354–62 (2011).
60. Ayyanar, M. & Ignacimuthu, S. Ethnobotanical survey of medicinal plants commonly used by Kani tribals in Tirunelveli hills of Western Ghats, India. *J. Ethnopharmacol.* 134, 851–864 (2011).
61. Jagtap, S. D., Deokule, S. S. & Bhosle, S. V. No Some unique ethnomedicinal uses of plants used by the Korku tribe of Amravati district of Maharashtra, India. *J. Ethnopharmacol.* 107, 463–469 (2006).
62. Hossain, M. Therapeutic orchids: traditional uses and recent advances. *Fitoterapia* 82, 102–40 (2011).
63. Lima, M. *et al.* *Ipomoea asarifolia* neutralizes inflammation induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom. *J. Ethnopharmacol.* 153, 890–5 (2014).
64. Uawonggul, N. *et al.* Plant extract activities against the fibroblast cell lysis by honey bee venom. *J. Med. Plants Res.* 5, 1978–1986 (2011).
65. Boron, W. & Boulpraep, E. *Ιατρική Φυσιολογία Κυτταρική και Μοριακή Προσέγγιση Τόμος Ι.* (Πασχαλίδης, Π.Χ., 2006).
66. Taylor, P., Camp, S. & Radic, Z. Acetylcholinesterase. *Encyclopedia of neuroscience Volume I* 5–7

- (2009).
67. Johnson, G. & Moore, S. W. The peripheral anionic site of acetylcholinesterase: structure, functions and potential role in rational drug design. *Curr. Pharm. Des.* 12, 217–225 (2006).
 68. Prince, M. & Jackson, J. World Alzheimer Report 2009. *Alzheimer's Dis. Int.* 1–96 (2009).
 69. Niikura, T., Tajima, H. & Kita, Y. Neuronal Cell Death in Alzheimers Disease and a Neuroprotective Factor, Humanin. *Curr. Neuropharmacol.* 4, 139–147 (2006).
 70. Maurer, K., Volk, S. & Gerbaldo, H. Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet* 349, 1546–1549 (1997).
 71. Crews, L. & Masliah, E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* 19, 12–20 (2010).
 72. Whitehouse, P. J., Price, D. L., Clark, a W., Coyle, J. T. & DeLong, M. R. Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann. Neurol.* 10, 122–6 (1981).
 73. Arendt, T., Bigl, V., Arendt, A. & Tennstedt, A. Loss of neurons in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's disease, paralysis agitans and Korsakoff's disease. *Acta Neuropathol.* 61, 101–108 (1983).
 74. Small, D. H. & Cappai, R. Alois Alzheimer and Alzheimer's disease: A centennial perspective. *J. Neurochem.* 99, 708–710 (2006).
 75. Heinrich, M. & Teoh, H. L. Galanthamine from snowdrop - The development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *J. Ethnopharmacol.* 92, 147–162 (2004).
 76. Francis, P. The Interplay of Neurotransmitters in Alzheimer's Disease. *CNS Spectr.* 10, 6–9 (2005).
 77. Draczkowski, P. *et al.* Determination of affinity and efficacy of acetylcholinesterase inhibitors using isothermal titration calorimetry. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1860, 967–974 (2016).
 78. Colovic, M. B., Krstic, D. Z., Lazarevic-Pasti, T. D., Bondzic, A. M. & Vasic, V. M. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Curr. Neuropharmacol.* 11, 315–335 (2013).
 79. García-Carrasco, M., Escárcega, R. O., Fuentes-Alexandro, S., Riebeling, C. & Cervera, R. Therapeutic options in autoimmune myasthenia gravis. *Autoimmun. Rev.* 6, 373–378 (2007).
 80. Goldblum, D., Garweg, J. G. & Bohnke, M. Topical rivastigmine, a selective acetylcholinesterase inhibitor, lowers intraocular pressure in rabbits. *J Ocul Pharmacol Ther* 16, 29–35 (2000).
 81. Howes, M. J. R., Perry, N. S. L. & Houghton, P. J. Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders. *Phyther. Res.* 17, 1–18 (2003).
 82. Wiendl, H. *et al.* Gaps Between Aims and Achievements in Therapeutic Modification of Neuronal Damage ('Neuroprotection'). *Neurotherapeutics* 12, 449–454 (2015).

83. Plaitakis, A. & C. Duvoisin, R. Homer's Moly Identified as *Galanthus nivalis* L.: Physiologic Antidote to Stramonium Poisoning. *Clinical Neuropharmacology* 6, 1–5 (1983).
84. Fraser, J. R. E. ., Laurent, T. C. . & Laurent, U. B. G. The nature of hyaluronan. *J. Intern. Med.* 242, 27–33 (1997).
85. Bakke, M., Kamei, J. I. & Obata, A. Identification, characterization, and molecular cloning of a novel hyaluronidase, a member of glycosyl hydrolase family 16, from *Penicillium* spp. *FEBS Lett.* 585, 115–120 (2011).
86. Braun, S. New Inhibitors of bacterial hyaluronidase - Synthesis and structure-activity relationships. (2005).
87. Astériou, T., Vincent, J. C., Tranchepain, F. & Deschrevel, B. Inhibition of hyaluronan hydrolysis catalysed by hyaluronidase at high substrate concentration and low ionic strength. *Matrix Biol.* 25, 166–174 (2006).
88. Girish, K. S. & Kemparaju, K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. *Life Sci.* 80, 1921–1943 (2007).
89. Laurent, T. C., Laurent, U. B. & Fraser, J. R. E. The structure and function of hyaluronan: An overview. *Immunol. Cell Biol.* 74, A1–A7 (1996).
90. Girish, K. S., Kemparaju, K., Nagaraju, S. & Vishwanath, B. S. Hyaluronidase inhibitors: a biological and therapeutic perspective. *Curr. Med. Chem.* 16, 2261–88 (2009).
91. Laurent, T., Laurent, U. & Fraser, J. Serum hyaluronan as a disease marker. *Ann Med* 28, 241–53 (1996).
92. Robert, S. *Hyaluronan in Cancer Biology*.
93. Cowman, M. K., Lee, H. G., Schwertfeger, K. L., McCarthy, J. B. & Turley, E. A. The content and size of hyaluronan in biological fluids and tissues. *Front. Immunol.* 6, 1–8 (2015).
94. Aya, K. L. & Stern, R. Hyaluronan in wound healing: Rediscovering a major player. *Wound Repair Regen.* 22, 579–593 (2014).
95. Girish, K. S., Jagadeesha, D. K., Rajeev, K. B. & Kemparaju, K. Snake venom hyaluronidase: An evidence for isoforms and extracellular matrix degradation. *Mol. Cell. Biochem.* 240, 105–110 (2002).
96. Kemparaju, K. & Girish, K. S. Snake venom hyaluronidase: A therapeutic target. *Cell Biochem. Funct.* 24, 7–12 (2006).
97. Muckenschnabel, I. Quantitation of hyaluronidases by the Morgan – Elson reaction : comparison of the enzyme activities in the plasma of tumor patients and healthy volunteers. *Cancer* 131, 13–20 (1998).
98. Nawy, S. S., Csóka, A. B., Mio, K. & Stern, R. Hyaluronidase Activity and Hyaluronidase Inhibitors Assay Using a Microtiter-Based System. *Methods Mol. Biol.* 171, 383–389 (2001).

99. Botzki, A. *et al.* L-ascorbic acid 6-hexadecanoate, a potent hyaluronidase inhibitor. X-ray structure and molecular modeling of enzyme-inhibitor complexes. *J. Biol. Chem.* 279, 45990–45997 (2004).
100. Mio, K. & Stern, R. Inhibitors of the hyaluronidases. *Matrix Biol.* 21, 31–37 (2002).
101. Scotti, L. *et al.* Recent Advancement in Natural Hyaluronidase Inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.* 16, 2525–2531 (2016).
102. Machiah, D. K., Girish, K. S. & Gowda, T. V. A glycoprotein from a folk medicinal plant, *Withania somnifera*, inhibits hyaluronidase activity of snake venoms. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 143, 158–161 (2006).
103. Marquina, M. A., Corao, G. M., Araujo, L., Buitrago, D. & Sosa, M. Hyaluronidase inhibitory activity from the polyphenols in the fruit of blackberry (*Rubus fruticosus* B.). *Fitoterapia* 73, 727–729 (2002).
104. Piwowarski, J. P., Kiss, A. K. & Kozłowska-Wojciechowska, M. Anti-hyaluronidase and anti-elastase activity screening of tannin-rich plant materials used in traditional Polish medicine for external treatment of diseases with inflammatory background. *J. Ethnopharmacol.* 137, 937–941 (2011).
105. Ippoushi, K., Yamaguchi, Y., Itou, H., Azuma, K. & Higashio, H. Evaluation of Inhibitory Effects of Vegetables and Herbs on Hyaluronidase and Identification of Rosmarinic Acid as a Hyaluronidase Inhibitor in Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.). *Food Sci. Technol. Res.* 6, 74–77 (2000).
106. Urata, T. M., Iyase, T. M., Oshizaki, F. Y. & Both, J. R. Hyaluronidase Inhibitory Rosmarinic Acid Derivatives from *Meehanian urticifolia*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 59, 88–95 (2011).
107. Murata, T., Watahiki, M., Tanaka, Y., Miyase, T. & Yoshizaki, F. Hyaluronidase Inhibitors from Takuran, *Lycopus lucidus*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 58, 394–397 (2010).
108. Maity, N., Nema, N. K., Abedy, M. K., Sarkar, B. K. & Mukherjee, P. K. Exploring *Tagetes erecta* Linn flower for the elastase, hyaluronidase and MMP-1 inhibitory activity. *J. Ethnopharmacol.* 137, 1300–1305 (2011).
109. Citalingam, K., Zareen, S., Shaari, K. & Ahmad, S. Effects of *Payena dasyphylla* (Miq.) on hyaluronidase enzyme activity and metalloproteinases protein expressions in interleukin-1 β stimulated human chondrocytes cells. *BMC Complement. Altern. Med.* 13, 1 (2013).
110. Lee, K. K., Cho, J. J., Park, E. J. & Choi, J. D. Anti-elastase and anti-hyaluronidase of phenolic substance from *Areca catechu* as a new anti-ageing agent. *Int. J. Cosmet. Sci.* 23, 341–346 (2001).
111. Nema, N. K., Maity, N., Sarkar, B. & Mukherjee, P. K. *Cucumis sativus* fruit-potential antioxidant, anti-hyaluronidase, and anti-elastase agent. *Arch. Dermatol. Res.* 303, 247–252 (2011).
112. Myose, M., Warashina, T. & Miyase, T. Triterpene saponins with hyaluronidase inhibitory activity from the seeds of *Camellia sinensis*. *Chem. Pharm. Bull.* 60, 612–623 (2012).
113. Ratnasooriya, W. D., Abeysekera, W. P. K. M. & Ratnasooriya, C. T. D. In vitro anti-hyaluronidase activity of Sri Lankan low grown orthodox orange pekoe grade black tea (*Camellia sinensis* L.). *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 4, 959–963 (2014).

114. Barla, F. *et al.* Inhibitive Effects of Alkyl Gallates on Hyaluronidase and Collagenase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 2335–2337 (2009).
115. Sawabe, Y. *et al.* Studies on hyaluronidase inhibitor of *Gymnema sylvestre* R. Br. *Eisei kagaku* 36, 314–319 (1990).
116. Sahasrabudhe, A. & Deodhar, M. Anti-hyaluronidase, Anti-elastase Activity of *Garcinia indica*. *Int. J. Bot.* 6, 299–303 (2010).
117. Ao, C., Higa, T., Ming, H., Ding, Y. T. & Tawata, S. Isolation and identification of antioxidant and hyaluronidase inhibitory compounds from *Ficus microcarpa* L. fil. bark. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 25, 406–413 (2010).
118. Menzel, E. J. & Farr, C. Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: Biochemistry, biological activities and therapeutic uses. *Cancer Lett.* 131, 3–11 (1998).
119. Khalil, M. B. *et al.* Lipodomics era: Accomplishments and challenges. *Mass Spectrom. Rev.* 29, 877–929 (2010).
120. Dennis, E. A. Introduction to Thematic Review Series: Phospholipases: Central Role in Lipid Signaling and Disease. *J. Lipid Res.* 56, 1245–1247 (2015).
121. Schaloske, R. H. & Dennis, E. A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1761, 1246–1259 (2006).
122. Six, D. a & Dennis, E. a. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell. Biol. Lipids* 1488, 1–19 (2000).
123. Magrioti, V. & Kokotos, G. Phospholipase A2 inhibitors as potential therapeutic agents for the treatment of inflammatory diseases. *Expert Opin. Ther. Pat.* 20, 1–18 (2010).
124. Σμυρνιώτου, Α. Σύνθεση και μελέτη νέων αναστολέων ενδοκυτταρικών φωσφολιπασών A2 με πιθανή αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση. (Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2015).
125. Burke, J. E. & Dennis, E. A. Phospholipase A₂ structure/function, mechanism, and signaling. *J. Lipid Res.* 50, S237–S242 (2009).
126. Lambeau, G. & Gelb, M. H. Biochemistry and Physiology of Mammalian Secreted Phospholipases A₂. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 495–520 (2008).
127. Glaser, K. B. Regulation of Phospholipase A2 Enzymes: Selective Inhibitors and their Pharmacological Potential BT - (null). *Adv. Pharmacol.* 32, 31–66 (1995).
128. Nirmal, N., Om Praba, G. & Velmurugan, D. Modeling studies on phospholipase A2-inhibitor complexes. *Indian J. Biochem. Biophys.* 45, 256–262 (2008).
129. Marcussi, S. *et al.* Snake Venom Phospholipase A2 Inhibitors: Medicinal Chemistry and Therapeutic Potential. *Curr. Top. Med. Chem.* 7, 743–756 (2007).
130. Andrés, J., Camilo, A., Núñez, V. & Osorio, E. The biflavonoid morelloflavone inhibits the enzymatic

- and biological activities of a snake venom phospholipase A2. *Chem. Biol. Interact.* 220, 94–101 (2014).
131. Aparecida, C. *et al.* Quercetin as an inhibitor of snake venom secretory phospholipase A2. *Chem. Biol. Interact.* 189, 9–16 (2011).
 132. Lindahl, M. & Tagesson, C. Flavonoids as phospholipase A2 inhibitors: Importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A2. *Inflammation* 21, 347–356 (1997).
 133. Cragg, G. M. & Newman, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. *J. Ethnopharmacol.* 100 (1-2), 72–9 (2005).
 134. Cordell, G. A., Beecher, C. W. W. & Pezzuto, J. M. Can ethnopharmacology contribute to the development of new anticancer drugs? *J. Ethnopharmacol.* 32, 117–133 (1991).
 135. Graham, J. G., Quinn, M. L., Fabricant, D. S. & Farnsworth, N. R. Plants used against cancer - An extension of the work of Jonathan Hartwell. *J. Ethnopharmacol.* 73, 347–377 (2000).
 136. Retief, F.P. & Cilliers, L. Tumours and cancers in graeco-roman times. *South African Med. J.* 91, 344–348 (2001).
 137. Retief, F. P. & Cilliers, L. Breast cancer in antiquity. *South African Med. J.* 101, 513–515 (2011).
 138. Κούζης, Α. *Ο καρκίνος παρα τοις αρχαιοις ελλησιν ιατροις.* (2004).
 139. Riddle, J. Ancient and medieval chemotherapy for cancer. *Isis* 76, 319–330 (1985).
 140. Ευτυχιάδου, Α. *Εισαγωγή εις την Βυζαντινήν Θεραπευτικήν.* (1983).
 141. Καραμπερόπουλος, Δ. Βυζαντινή Θεραπευτική. in *Βυζάντιο-Βενετία-Νεώτερος Ελληνισμός. Μια περιπλάνηση στον κόσμο της επιστημονικής σκέψης* 91–100 (2004).
 142. Bojczuk, M., Żyżelewicz, D. & Hodurek, P. Centrifugal partition chromatography – A review of recent applications and some classic references. *J. Sep. Sci.* 40, 1597–1609 (2017).
 143. Friesen, B. & Pauli, G. Solvent Selection in Countercurrent Chromatography (CCC). *Countercurrent.Org* 1–11 (2015).
 144. Liu, Y., Brent Friesen, B., McAlpine, J. B. & Pauli, G. F. Solvent System Selection Strategies in Countercurrent Separation. *Planta Med.* 81, 1582–1591 (2015).
 145. Berthod, A., Hassoun, M. & Ruiz-Angel, M. J. Alkane effect in the Arizona liquid systems used in countercurrent chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* 383, 327–340 (2005).
 146. Yoon, K. D., Chin, Y.-W. & Kim, J. Centrifugal Partition Chromatography: Application To Natural Products in 1994–2009. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 33, 1208–1254 (2010).
 147. Kumar, G. M., Neelam, I., Ajitha, A. & Rao, V. U. M. Centrifugal Partition Chromatography: An Overview. *Int. J. Pharm. Res. Anal.* 4, 200–205 (2014).

148. Miliauskas, G., Venskutonis, P. R. & Van Beek, T. A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem.* 85, 231–237 (2004).
149. Chatatikun, M. & Chiabchalard, A. Phytochemical screening and free radical scavenging activities of orange baby carrot and carrot (*Daucus carota* Linn.) root crude extracts. *J. Chem. Pharm. Res.* 5, 97–102 (2013).
150. Molyneux, P. The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26, 211–219 (2004).
151. Koleva, I. I., van Beek, T. a, Linssen, J. P. H., de Groot, A. & Evstatieva, L. N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem. Anal.* 13, 8–17 (2002).
152. Braña, A. F. *et al.* Lobophorin K, a new natural product with cytotoxic activity produced by *Streptomyces* sp. M-207 associated with the deep-sea coral *Lophelia pertusa*. *Mar. Drugs* 15, 4–11 (2017).
153. Yang, S. *et al.* Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of constituents from *Toona sinensis* on human cancer cells. *Cancer Cell Int.* 13, 1–8 (2013).
154. Acker, M. G. & Auld, D. S. Considerations for the design and reporting of enzyme assays in high-throughput screening applications. *Perspect. Sci.* 1, 56–73 (2014).
155. Koh, D. C. I., Armugam, A. & Jeyaseelan, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 3030–3041 (2006).
156. Iwanaga, S. & Suzuki, T. Enzymes in snake venom. *Handb. Exp. Pharmacol.* 61–158 (1979). doi:10.1007/978-3-642-66913-2_4
157. Shabbir, A., Shahzad, M., Masci, P. & Gobe, G. C. Protective activity of medicinal plants and their isolated compounds against the toxic effects from the venom of *Naja* (cobra) species. *J. Ethnopharmacol.* 157, 222–227 (2014).
158. Talesa, V. N. Acetylcholinesterase in Alzheimer’s disease. *Mech. Ageing Dev.* 122, 1961–1969 (2001).
159. García-Ayllón, M.-S. Revisiting the role of acetylcholinesterase in Alzheimer’s disease: cross-talk with P-tau and β -amyloid. *Front. Mol. Neurosci.* 4, 1–9 (2011).
160. Mruwat, R., Cohen, Y. & Yedgar, S. Phospholipase A(2) inhibition as potential therapy for inflammatory skin diseases. *Immunotherapy* 5, 315–7 (2013).
161. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. Jr., Feather-Stone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7, 88–95 (1961).
162. Hasnat, M. A., Pervin, M. & Lim, B. O. Acetylcholinesterase inhibition and in vitro and in vivo antioxidant activities of *Ganoderma lucidum* grown on germinated brown rice. *Molecules* 18, 6663–6678 (2013).

163. Saleem Ali-Shtayeh, M. *et al.* In-vitro screening of acetylcholinesterase inhibitory activity of extracts from Palestinian indigenous flora in relation to the treatment of Alzheimer's disease. *Funct. Foods Heal. Dis.* 4, 381–400 (2014).
164. Kaessler, A., Nourrisson, M. R., Duflos, M. & Jose, J. Indole carboxamides inhibit bovine testes hyaluronidase at pH 7.0 and indole acetamides activate the enzyme at pH 3.5 by different mechanisms. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 23, 719–727 (2008).
165. Samee, H., Li, Z., Lin, H., Khalid, J. & Guo, Y. Anti-allergic effects of ethanol extracts from brown seaweeds. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 10, 147–153 (2009).
166. Boka, V. I. *et al.* Could multivariate statistics exploit HPTLC and NMR data to reveal bioactive compounds? The case of *Paeonia mascula*. *Phytochem. Lett.* 20, 379–385 (2017).
167. Aligiannis, N. *et al.* Heterocovariance Based Metabolomics as a Powerful Tool Accelerating Bioactive Natural Product Identification. *ChemistrySelect* 1, 2531–2535 (2016).
168. Σάνη, Μ. Διερεύνηση και εφαρμογή της Στατιστικής φασματοσκοπίας σε φυσικά προϊόντα και ανάπτυξη κώδικα για επεξεργασία των δεδομένων φασματομετρίας μάζας σε προϊόντα κλασματοποίησης CPC. (2016).

8 Συλλογή φυτικών ειδών

Η επιλογή των υποψήφιων προς συλλογή φυτικών ειδών έγινε από τις δύο λίστες που δημιουργήθηκαν από τα έργα θεραπευτικής (λαμβάνοντας υπόψη το *Περί Ιατρικής Ύλης* του Διοσκουρίδη) και μετά από αναζήτηση της βιβλιογραφίας σχετικά με τους περιεχόμενους δευτερογενείς μεταβολίτες, τις βιολογικές ιδιότητες και τις φαρμακολογικές δράσεις τους. Στις περιπτώσεις που υπήρχε αμφιβολία για το ακριβές είδος ή το αναφερόμενο είδος ήταν αρκετά μελετημένο, προτιμήθηκε η συλλογή συγγενούς είδους με σκοπό την απομόνωση νέων βιοδραστικών ουσιών. Σε αρκετές περιπτώσεις έλαβε χώρα η συλλογή και άλλων δρογών εκτός των αναφερόμενων τμημάτων των επιλεγμένων ειδών. Οι συλλογές των φυτικών ειδών πραγματοποιήθηκαν κατά τη χρονική περίοδο άνοιξη 2015-2016 σε διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας, όπως π.χ. όρος Παρνασσός, όρος Δίρφυς, νήσος Ικαρία κ.τ.λ. Οι ταυτοποιήσεις των taxa πραγματοποιήθηκαν από το Δρ. Καλπουτζάκη Ελευθέριο και η ονοματολογία έχει γίνει με βάση το σύγγραμμα *Vascular Plants of Greece: An Annotated Checklist* και την ιστοσελίδα <http://www.theplantlist.org/>. Η ξήρανση των φυτικών ειδών έλαβε χώρα είτε σε σκιερό και ευάερο χώρο είτε με λυοφιλοποιητή, ενώ κάποια διατηρήθηκαν νωπά στους -20°C μέχρι να εκχυλιστούν. Σε πολλά είδη που συλλέχθηκαν υπάρχουν δείγματα ερμπαρίου, τα οποία βρίσκονται στο εργαστήριο του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυτικών Προϊόντων. Τα φυτικά είδη, ο χρόνος και ο τόπος συλλογής τους παρουσιάζονται αναλυτικά στον επόμενο πίνακα:

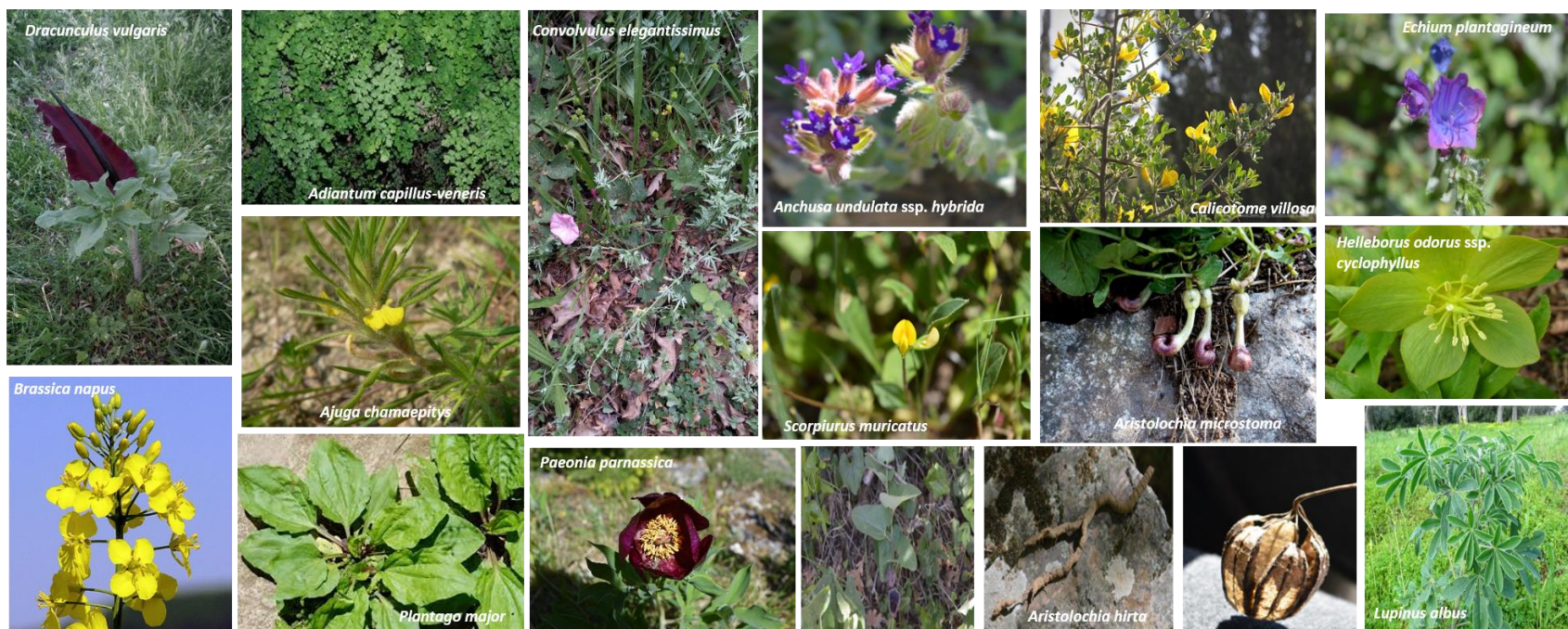
Πίνακας 6. Συλλογή φυτικών ειδών

	Λατινική ονομασία	Οικογένεια	Τμήμα φυτού	Ημερομηνία συλλογής	Τόπος συλλογής	Ξήρανση
1	<i>Prasium majus</i> L.	Lamiaceae	φύλλα	06.05.2015	Πανεπιστημιούπολη Ζωγράφου (κάτω από το κτίριο ενέργειας)	σκιερό και ευάερο μέρος
2	<i>Lupinus albus</i> L.	Fabaceae	καρποί, σπέρματα	28.05.2015	Υμηττός (ακαλλιέργητος ελαιώνας κοντά στο Μοναστήρι της Καισαριανής/δεξιά πλευρά του δρόμου)	σκιερό και ευάερο μέρος
3	<i>Helleborus odorus</i> Waldst. & Kit. Ex Willd. ssp. <i>cyclophyllus</i> (A. Braun) Maire & Petitm	Ranunculaceae	ρίζες και υπέργεια τμήματα	10.05.2015	Δίρφυς κοντά στο ορειβατικό καταφύγιο υψόμετρο 1100m (38° 36' 39.45" Β 23° 51' 41.16" Ε) αραίο δάσος <i>Abies cephalonica</i> ασβεστολιθικό	λυοφιλοποίηση
4	<i>Marrubium vulgare</i> L.	Lamiaceae	υπέργεια τμήματα	13.05.2015	Κερατσίνι Αττικής (δημόσια έκταση πάνω από το λιμανάκι)	σκιερό και ευάερο μέρος
5	<i>Brassica napus</i> L.	Brassicaceae	φύλλα	13.05.2015	Κερατσίνι Αττικής	λυοφιλοποίηση
6	<i>Iris germanica</i> L.	Iridaceae	ρίζες και υπέργεια τμήματα	21.05.2015	Πεντελικό όρος	λυοφιλοποίηση
7	<i>Aristolochia elongata</i> (Duch.) E. Nardi	Aristolochiaceae	ρίζες και υπέργεια τμήματα	10.05.2015	Δίρφυς υψόμετρο 980m (38° 36' 13.36" Β 23° 52' 20.02" Ε)	λυοφιλοποίηση
8	<i>Aristolochia microstoma</i> Boiss. & Spruner	Aristolochiaceae	ρίζες και υπέργεια τμήματα	13.05.2015	Πανεπιστημιούπολη Ζωγράφου (κάτω από το κτίριο ενέργειας)	λυοφιλοποίηση
9	<i>Sinapis alba</i> L.	Brassicaceae	καρποί, σπέρματα	13.05.2015	Πανεπιστημιούπολη Ζωγράφου (κάτω από το κτίριο ενέργειας)	σκιερό και ευάερο μέρος

	Λατινική ονομασία	Οικογένεια	Τμήμα φυτού	Ημερομηνία συλλογής	Τόπος συλλογής	Ξήρανση
10	<i>Teucrium capitatum</i> L.	Lamiaceae	υπέργεια τμήματα	20.05.2015	Πανεπιστημιούπολη Ζωγράφου (ακαλλιέργητος ελαιώνας)	σκιερό και ευάερο μέρος
11	<i>Teucrium divaricatum</i> Heldr. Ssp. <i>divaricatum</i>	Lamiaceae	υπέργεια τμήματα	20.05.2015	Πανεπιστημιούπολη Ζωγράφου (ακαλλιέργητος ελαιώνας)	σκιερό και ευάερο μέρος
12	<i>Teucrium scordium</i> L.	Lamiaceae	υπέργεια τμήματα	24.05.2015	Κύμη Ευβοίας (υψόμετρο 200m, περιοχή Platanenhof)	σκιερό και ευάερο μέρος
13	<i>Calicotome villosa</i> (Poir.) Link	Fabaceae	υπέργεια τμήματα	20.05.2015	Πανεπιστημιούπολη Ζωγράφου (ακαλλιέργητος ελαιώνας)	σκιερό και ευάερο μέρος
14	<i>Plantago major</i> L.	Plantaginaceae	φύλλα	23.05.2015	Κύμη Ευβοίας (υψόμετρο 200m, περιοχή Platanenhof)	νωπό
15	<i>Convolvulus elegantissimus</i> Mill.	Convolvulaceae	υπέργεια τμήματα	23.05.2015	Κύμη Ευβοίας (υψόμετρο 200m, περιοχή Platanenhof)	σκιερό και ευάερο μέρος
16	<i>Ajuga chamaepitys</i> (L.) Schreb.	Lamiaceae	υπέργεια τμήματα	23.05.2015	Κύμη Ευβοίας (υψόμετρο 200m, περιοχή Platanenhof)	σκιερό και ευάερο μέρος
17	<i>Dracunculus vulgaris</i> Schott.	Araceae	ρίζες και υπέργεια τμήματα	23.05.15	Κύμη Ευβοίας (υψόμετρο 200m, περιοχή Platanenhof)	λυοφιλοποίηση
18	<i>Arum italicum</i> Mill.	Araceae	ρίζες	23.05.15	Κύμη Ευβοίας (υψόμετρο 200m, περιοχή Platanenhof)	λυοφιλοποίηση
19	<i>Adiantum capillus-veneris</i> L.	Pteridaceae	υπέργεια τμήματα	24.05.15	Κύμη Ευβοίας (υψόμετρο 200m, περιοχή Platanenhof, Ρέμα Μέλας)	σκιερό και ευάερο μέρος

	Λατινική ονομασία	Οικογένεια	Τμήμα φυτού	Ημερομηνία συλλογής	Τόπος συλλογής	Ξήρανση
20	<i>Cynoglossum creticum</i> Mill.	Boraginaceae	υπέργεια τμήματα	23.05.15	Κύμη Ευβοίας (υψόμετρο 200m, περιοχή Platanenhof)	σκιερό και ευάερο μέρος
21	<i>Ononis viscosa</i> L.	Fabaceae	υπέργεια τμήματα	24.05.15	Κύμη Ευβοίας (υψόμετρο 200m, περιοχή Platanenhof)	σκιερό και ευάερο μέρος
22	<i>Ruta graveolens</i> L.	Rutaceae	υπέργεια τμήματα	10.06.2015	Μονή Αγ. Πατέρων προς την πλευρά που βλέπει την Αττική, όρια Αιγάλεω/Μονή Αγ. Αναργύρων, λόφος πάνω από το Πέραμα Αττικής	σκιερό και ευάερο μέρος
23	<i>Isatis tomentella</i> Boiss. & Balansa	Brassicaceae	υπέργεια τμήματα	28.05.2015	Πάρνωνας (υψόμετρο 900 m)	σκιερό και ευάερο μέρος
24	<i>Mentha longifolia</i> (L.) L.	Lamiaceae	ολόκληρο φυτό	10.08.2015	Πάρνωνας (υψόμετρο 900 m)	σκιερό και ευάερο μέρος
25	<i>Cyclamen graecum</i> Link	Primulaceae	ρίζες	10.10.2015	Πεντελικό όρος	λυοφιλοποίηση
26	<i>Sternbergia lutea</i> (L.) Ker Gawl. ex Spreng.	Amaryllidaceae	ρίζες και άνθη	10.10.2015	Πεντελικό όρος (περιοχή Μικρή Καλλιθέα)	λυοφιλοποίηση
27	<i>Aristolochia hirta</i> L.	Aristolochiaceae	ρίζες και υπέργεια τμήματα	16.04.2016	Ικαρία (χωριό Πετροπούλι)	λυοφιλοποίηση
28	<i>Anchusa undulata</i> ssp. <i>hybrida</i> (Ten.) Cout.	Boraginaceae	ρίζες και υπέργεια τμήματα	16.04.2016	Ικαρία (περιοχή Κοσσίκια)	λυοφιλοποίηση (ρίζες) σκιερό και ευάερο μέρος (υπέργεια)
29	<i>Echium plantagineum</i> L.	Boraginaceae	ρίζες και υπέργεια τμήματα	16.04.2016	Ικαρία (περιοχή Δάφνη)	λυοφιλοποίηση (ρίζες) σκιερό και ευάερο μέρος (υπέργεια)
30	<i>Scorpiurus muricatus</i> L.	Fabaceae	ολόκληρο φυτό	16.04.2016	Ικαρία (περιοχή Στελι)	σκιερό και ευάερο μέρος

	Λατινική ονομασία	Οικογένεια	Τμήμα φυτού	Ημερομηνία συλλογής	Τόπος συλλογής	Ξήρανση
31	<i>Paeonia parnassica</i> Tzanoud.	Raeoniaceae	ρίζες και υπέργεια τμήματα	26.04.2016	Παρνασσός (υψόμετρο 1200 m, περιοχή Έλατος)	λυοφιλοποίηση



Εικόνα 74. Συλλεχθέντα φυτικά είδη

9 Παρασκευή εκχυλισμάτων - Έλεγχος Χημικού φορτίου - Βιολογική Αξιολόγηση

Το κάθε φυτικό υλικό που συλλέχθηκε και ξηράνθηκε, κονιοποιήθηκε με τη χρήση κατάλληλων συσκευών και ποσότητα της κόνεως εκχυλίστηκε σε συσκευή υπερήχων διαδοχικά με διχλωρομεθάνιο, αλκοόλη (μεθανόλη ή αιθανόλη) και αλκοόλη/νερό 50/50 (μεθανόλη ή αιθανόλη). Η αναλογία κόνεως/διαλύτη ήταν 1/10 ενώ για κάθε διαλύτη ή μείγμα διαλυτών πραγματοποιήθηκαν δύο κύκλοι εκχύλισης, διάρκειας 30 λεπτών ο καθένας. Ο δεύτερος κύκλος εκχύλισης με αλκοόλη/νερό 50/50 είχε διάρκεια μιας νύχτας (περίπου 12 ώρες). Καθ' όλη τη διάρκεια των εκχυλίσεων η θερμοκρασία παρέμενε σταθερή στους 25 °C – 30 °C. Τα υγρά παρασκευάσματα διηθήθηκαν και ακολούθως ο διαλύτης του διηθήματος απομακρύνθηκε υπό κενό σε συσκευή Rotavapor, ενώ το νερό απομακρύνθηκε με λυοφιλοποίηση. Τα εκχυλίσματα αποθηκεύτηκαν σε ξηρή μορφή εντός σκουρόχρωμων φιαλιδίων. Ακολουθεί ο πίνακας των παρασκευασθέντων εκχυλισμάτων όπου παρουσιάζονται οι δρόγες (επισημαίνεται όπου υπήρχαν άνθη ή καρποί στα υπέργεια τμήματα) και οι κωδικοί των εκχυλισμάτων (Πίνακας 7). Επίσης, στον πίνακα έχουν συμπεριληφθεί εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα και μεθανόλης, τα οποία παρασκευάστηκαν με επιταχυνόμενη εκχύλιση από δείγματα που προϋπήρχαν στη συλλογή του Εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων και τα οποία χρησιμοποιήθηκαν εν συνεχεία για συγκρίσεις χημικού φορτίου και βιολογικής δράσης εκχυλισμάτων συγγενών συλλεχθέντων φυτικών ειδών. Τέλος πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με υπερκρίσιμο CO₂ (SFE) σε ένα μέρος των ριζών του είδους *Paeonia marnassica*, και αναφέρονται τα αποτελέσματα της εκχύλισης, πληροφορίες για το χημικό περιεχόμενο και τη βιολογική δράση των εκχυλισμάτων που προέκυψαν, ενώ οι συνθήκες του πειράματος αναλύονται στο αντίστοιχο κεφάλαιο.

Πίνακας 7. Ολικά εκχυλίσματα

	Λατινική Ονομασία	Οικογένεια	Τμήμα φυτού	Κωδικός εκχυλίσματος DCM	Κωδικός εκχυλίσματος EtOAc	Κωδικός εκχυλίσματος MeOH ή EtOH	Κωδικός εκχυλίσματος MeOH ή EtOH/H ₂ O
1	<i>Asphodeline lutea</i>	Xanthorrhoeaceae	ρίζες	-	ALRA	ALRB	-
2	<i>Hypericum perforatum</i>	Hypericaceae	υπέργεια τμήματα	-	HPYA	HPYB	-
3	<i>Verbena officinalis</i>	Verbenaceae	υπέργεια τμήματα και ρίζες	-	VOWA	VOWB	-
4	<i>Portulaca oleracea</i>	Portulacaceae	υπέργεια τμήματα	-	POYA	POYB	-
5	<i>Adiantum capillus-veneris</i>	Pteridaceae	ολόκληρο φυτό	ACWA	-	ACWB	ACWC
6	<i>Iris germanica</i>	Iridaceae	ρίζες	IGRA	-	IGRB	IGRC
7	<i>Helleborus odorus</i> ssp. <i>cyclophyllus</i>	Ranunculaceae	ρίζες	HORA	-	HORB	HORC
8	<i>Cyclamen graecum</i>	Primulaceae	ρίζες	CGRA	-	CGRB	CGRC
9	<i>Plantago major</i>	Plantaginaceae	νωπά φύλλα	PMA	-	PMB	-
10	<i>Dracunculus vulgaris</i>	Araceae	νωπές ρίζες	DVRWA	-	DVRWB	-
11	<i>Dracunculus vulgaris</i>	Araceae	ρίζες	DVRA	-	DVRB	DVRC

	Λατινική Ονομασία	Οικογένεια	Τμήμα φυτού	Κωδικός εκχυλίσματος DCM	Κωδικός εκχυλίσματος EtOAc	Κωδικός εκχυλίσματος MeOH ή EtOH	Κωδικός εκχυλίσματος MeOH ή EtOH/H ₂ O
12	<i>Arum italicum</i>	Araceae	νωπές ρίζες	AIRA	-	AIRB	-
13	<i>Convolvulus elegantissimus</i>	Convolvulaceae	ανθισμένα υπέργεια τμήματα	CEYA	-	CEYB	CEYC
14	<i>Ruta graveolens</i>	Rutaceae	ανθισμένα υπέργεια τμήματα	RGYA	-	RGYB	RGYC
15	<i>Sternbergia lutea</i>	Amaryllidaceae	ρίζες	SLRA	-	SLRB	SLRC
16	<i>Sternbergia lutea</i>	Amaryllidaceae	άνθη	SLFA	-	SLFB	SLFC
17	<i>Narcissus tazetta</i>	Amaryllidaceae	βολβοί	NTBA	-	NTBB	NTBC
18	<i>Rhamnus lycioides</i> <i>ssp. graeca</i>	Rhamnaceae	υπέργεια τμήματα	-	-	RLYB	-
Boraginaceae							
19	<i>Cynoglossum creticum</i>	υπέργεια τμήματα με καρπούς		CCYA	-	CCYB	CCYC
20	<i>Anchusa caespitosa</i>	ολόκληρο φυτό		-	ACAWA	ACAWB	-
21	<i>Anchusa undulata</i>	ανθισμένα υπέργεια τμήματα		AUYA	-	AUYB	AUYC
22	<i>Anchusa undulata</i>	Ρίζες		AURA	-	AURB	AURC
23	<i>Echium angustifolium</i>	ανθισμένα υπέργεια τμήματα		-	EAYA	EAYB	-

	Λατινική Ονομασία	Οικογένεια	Τμήμα φυτού	Κωδικός εκχυλίσματος DCM	Κωδικός εκχυλίσματος EtOAc	Κωδικός εκχυλίσματος MeOH ή EtOH	Κωδικός εκχυλίσματος MeOH ή EtOH/H ₂ O
24	<i>Echium plantagineum</i>		ανθισμένα υπέργεια τμήματα	EPYA	-	EPYB	EPYC
25	<i>Echium plantagineum</i>		Ρίζες	EPRA	-	EPRB	EPRC
Asteraceae							
26	<i>Carlina corymbosa</i>		υπέργεια τμήματα	-	CCOYA	CCOYB	-
27	<i>Chrysanthemum segetum</i>		υπέργεια τμήματα	-	CSYA	CSYB	-
28	<i>Inula pseudolimonella</i>		υπέργεια τμήματα	-	IPYA	IPYB	-
29	<i>Inula verbascifolia</i> <i>ssp.methanaea</i>		ανθισμένα υπέργεια τμήματα	-	IVYA	IVYB	-
Paeoniaceae							
30	<i>Paeonia parnassica</i>		Ρίζες	Ppr100 (εκχύλισμα SFE, 100 bar)			
31	<i>Paeonia parnassica</i>		Ρίζες	Ppr300 (εκχύλισμα SFE, 300 bar)			
32	<i>Paeonia parnassica</i>		Ρίζες	PprE1 (εκχύλισμα SFE, 1% EtOH)			

	Λατινική Ονομασία	Οικογένεια	Τμήμα φυτού	Κωδικός εκχυλίσματος DCM	Κωδικός εκχυλίσματος EtOAc	Κωδικός εκχυλίσματος MeOH ή EtOH	Κωδικός εκχυλίσματος MeOH ή EtOH/H ₂ O
33	<i>Paeonia parnassica</i>		Ρίζες	PprE3 (εκχύλισμα SFE, 3% EtOH)			
34	<i>Paeonia parnassica</i>		Ρίζες	PprE5 (εκχύλισμα SFE, 5% EtOH)			
35	<i>Paeonia parnassica</i>		Ρίζες	PprE10 (εκχύλισμα SFE, 10% EtOH)			
36	<i>Paeonia parnassica</i>		Ρίζες	PPRA	-	PPRB	PPRC
37	<i>Paeonia parnassica</i>		ανθισμένα υπέργεια τμήματα	PPAA	-	-	PPAC
Aristolochiaceae							
38	<i>Aristolochia elongata</i>		ρίζες	AERA	-	AERB	AERC
39	<i>Aristolochia microstoma</i>		ρίζες	AMRA	-	AMRB	AMRC
40	<i>Aristolochia hirta</i>		ρίζες	AHRA	-	AHRB	AHRC
41	<i>Aristolochia hirta</i>		υπέργεια τμήματα (φύλλα-βλαστοί)	AHYA	-	AHYB	AHYC
42	<i>Aristolochia hirta</i>		άνθη	-	AHFA	AHFB	-
Lamiaceae							

	Λατινική Ονομασία	Οικογένεια	Τμήμα φυτού	Κωδικός εκχυλίσματος DCM	Κωδικός εκχυλίσματος EtOAc	Κωδικός εκχυλίσματος MeOH ή EtOH	Κωδικός εκχυλίσματος MeOH ή EtOH/H ₂ O
43	<i>Teucrium scordium</i>		υπέργεια τμήματα (αρχή άνθησης)	TSYA	-	TSYB	TSYC
44	<i>Teucrium capitatum</i>		υπέργεια τμήματα (αρχή άνθησης)	TCYA	-	TCYB	TCYC
45	<i>Teucrium divaricatum</i> ssp. <i>divaricatum</i>		υπέργεια τμήματα (αρχή άνθησης)	TDYA	-	TDYB	TDYC
46	<i>Mentha longifolia</i>		υπέργεια τμήματα (αρχή άνθησης)	MLYA	-	MLYB	MLYC
47	<i>Prasium majus</i>		Φύλλα	PMYA	-	PMYB	PMYC
48	<i>Marrubium vulgare</i>		υπέργεια τμήματα (αρχή άνθησης)	MVYA	-	MVYB	MVYC
49	<i>Marrubium velutinum</i> ssp. <i>velutinum</i>		ανθισμένα υπέργεια τμήματα	-	MVVYA	MVVYB	-
50	<i>Satureja thymbra</i>		ανθισμένα υπέργεια τμήματα	-	STYA	STYB	-
51	<i>Vitex agnus-castus</i>		Καρποί	-	VASA	VASB	-
52	<i>Origanum vulgare</i> ssp. <i>hirtum</i>		υπέργεια τμήματα	-	-	OVUYB	-
Brassicaceae							

	Λατινική Ονομασία	Οικογένεια	Τμήμα φυτού	Κωδικός εκχυλίσματος DCM	Κωδικός εκχυλίσματος EtOAc	Κωδικός εκχυλίσματος MeOH ή EtOH	Κωδικός εκχυλίσματος MeOH ή EtOH/H ₂ O
53	<i>Brassica napus</i>		Φύλλα	BNLA	-	BNLB	BNLC
54	<i>Brassica cretica</i>		υπέργεια τμήματα	-	-	BCYB	-
55	<i>Sinapis alba</i>		Σπέρματα	SASA	-	SASB	SASC
56	<i>Sinapis alba</i>		Καρποί	SAFA	-	SAFB	-
57	<i>Isatis tomentella</i>		ανθισμένα υπέργεια τμήματα	ITYA	-	ITYB	ITYC
58	<i>Sisymbrium irio</i>		υπέργεια τμήματα	-	-	SIYB	-
59	<i>Raphanus sativus</i>		Βολβοί	-	RSBA	RSBB	RSBC
Fabaceae							
60	<i>Melilotus graecus</i>		ολόκληρο φυτό	-	MGWA	MGWB	-
61	<i>Calicotome villosa</i>		υπέργεια τμήματα	CVYA	-	CVYB	CVYC
62	<i>Scorpiurus muricatus</i>		ολόκληρο φυτό (ανθισμένο)	SMA	-	SMB	SMC
63	<i>Ononis viscosa</i>		ολόκληρο φυτό (με καρπούς)	OVWA	-	OVWB	OVWC
64	<i>Lupinus albus</i>		Σπέρματα	LASA	-	LASB	LASC

Έλεγχος χημικού φορτίου

Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης - HPTLC

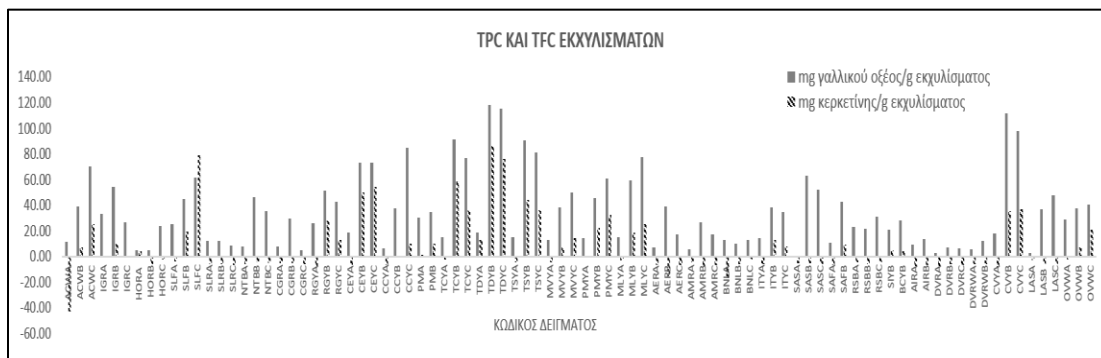
Τα παρασκευασθέντα εκχυλίσματα ελέγχθηκαν ως προς το χημικό τους φορτίο με τη χρήση χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC). Αρχικά παρασκευάστηκαν τα διαλύματα των ολικών εκχυλισμάτων συγκέντρωσης 2mg/mL και τα δείγματα (20μL) αποτέθηκαν σε γυάλινες πλάκες Silica gel 60 F254 (κανονικής φάσεως) με τη βοήθεια της συσκευής Automatic TLC Sampler 4 (ATS 4). Τα συστήματα ανάπτυξης που επιλέχθηκαν για τα άπολα εκχυλίσματα είναι: Toluene/EtOAc/FA 80:20:2 και DCM/MeOH 95:5 ενώ για τα πολικά εκχυλίσματα είναι: EtOAc/MeOH/H₂O/FA 50:10:7:1 και DCM/MeOH/H₂O 70:30:4. Η ανάπτυξη των πλακών έγινε με τη χρήση της συσκευής CAMAG Automatic Developing Chamber 2 (ADC 2). Στη συνέχεια παρελήφθησαν τα φάσματα υπεριώδους για κάθε ανεπτυγμένη κηλίδα με τη βοήθεια της συσκευής CAMAG TLC Scanner 3 στα εξής μήκη κύματος: 200 nm, 254 nm, 280 nm και 366 nm. Τέλος οι χρωματογραφικές πλάκες τοποθετήθηκαν στη συσκευή CAMAG TLC Visualizer 2 όπου φωτογραφήθηκαν στα μήκη κύματος 254 nm, 366 nm και στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα θεικής βανιλίνης με τη συσκευή CAMAG Chromatogram Immersion Device και φωτογραφήθηκαν όπως φαίνεται παρακάτω (Εικόνα 75, Εικόνα 76).

Υγρή χρωματογραφία-Φασματομετρία Μάζας - LC-MS

Τα ολικά εκχυλίσματα αξιολογήθηκαν ως προς το χημικό τους περιεχόμενο με υγρή χρωματογραφία - φασματομετρία μάζας σε θετικό και αρνητικό ιονισμό σε συγκέντρωση 100 µg/mL και τα χρωματογραφήματα παρουσιάζονται στο παράρτημα του κειμένου.

Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου – TPC

Προσδιορισμός ολικών περιεχόμενων φλαβονοειδών – TFC



Εικόνα 77. Ολικό φαινολικό περιεχόμενο εκφρασμένο σε mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος και ολικά περιεχόμενα φλαβονοειδή εκφρασμένα σε mg κερκετίνης/g εκχυλίσματος των ολικών εκχυλίσματων σε συγκέντρωση 400 µg/mL και 300 µg/mL αντίστοιχα (με εξαίρεση τα *HORA*, *SASA*, *LASA* που αξιολογήθηκαν στα 600 µg/mL λόγω της ελαιώδους μορφής τους)

Τα ολικά εκχυλίσματα αξιολογήθηκαν ως το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) και τα ολικά περιεχόμενα φλαβονοειδή (TFC) σε τελικές συγκεντρώσεις 400 µg/mL και 300 µg/mL (με εξαίρεση τα *HORA*, *SASA*, *LASA* που αξιολογήθηκαν στα 600 µg/mL λόγω της ελαιώδους μορφής τους), με χρήση των μεθόδων που έχουν περιγραφεί στην ενότητα Υλικά-Μέθοδοι-Τεχνικές.

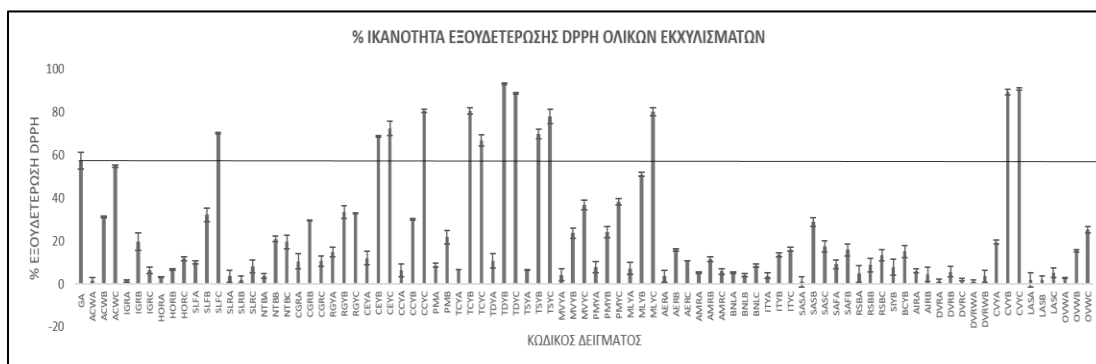
Τα εκχυλίσματα των ειδών *Adiantum capillus-veneris* (Pteridaceae), *ACWB* και *ACWC*, *Sternbergia lutea* (Amaryllidaceae) (άνθη), *SLFB* και *SLFC*, *Convolvulus elagantissimus* (Convolvulaceae), *CEYB* και *CEYC* και *Cynoglossum creticum* (Boraginaceae), *CCYC*, παρουσίασαν μέτριες περιεκτικότητες φαινολικών εκφρασμένες ως 38.96, 70.26, 44.64, 61.32, 73.21, 72.81 και 84.75 γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος, αντίστοιχα. Τα πολικά εκχυλίσματα της οικογένειας *Lamiaceae* εμφάνισαν υψηλότερες τιμές περιεκτικότητας σε φαινολικές ουσίες και συγκεκριμένα αυτά που προέρχονται από τα είδη *Teucrium capitatum*, *TCYB* και *TCYC*, *Teucrium divaricatum* ssp. *divaricatum*, *TDYB* και *TDYC*, *Teucrium scordium*, *TSYB* και *TSYC*, *Prasium majus*, *PMYC* και *Mentha longifolia*, *MLYB* και *MLYC*, εμφάνισαν τιμές 90.29, 76.82, 118.01, 115.28, 90.43, 80.92,

60.84, 59.09 και 77.69 mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος αντίστοιχα. Τα εκχυλίσματα των οικογενειών Aristolochiaceae, Brassicaceae και Araceae δεν φάνηκε να περιέχουν σημαντικές ποσότητες φαινολικών ενώ από την οικογένεια Fabaceae, μόνο τα πολικά εκχυλίσματα του είδους *Calicotome villosa*, CVYB και CVYC, παρουσίασαν υψηλές περιεκτικότητες 111.46 και 97.71 mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος.

Στη δοκιμασία προσδιορισμού ολικών περιεχόμενων φλαβονοειδών στα εκχυλίσματα τα αποτελέσματα παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα με τον παραπάνω προσδιορισμό των ολικών φαινολικών παραγώγων. Πιο συγκεκριμένα, αξιόλογες είναι οι τιμές 79.05, 50.10 και 54.08 mg κερκετίνης/g εκχυλίσματος των πολικών εκχυλισμάτων των ειδών *Sternbergia lutea* (Amaryllidaceae) (άνθη), SLFB και *Convolvulus elagantissimus* (Convolvulaceae), CEYB και CEYC. Επίσης, ανάλογες τιμές περιεκτικότητας σε φλαβονοειδή εμφάνισαν τα εκχυλίσματα της οικογένειας Lamiales και πιο συγκεκριμένα 44.07, 36.16, 58.67, 36.18, 86.32, 75.73 και 32.87 mg κερκετίνης/g εκχυλίσματος για τα εκχυλίσματα των ειδών *Teucrium scordium*, TSYB και TSYC, *Teucrium capitatum*, TCYB και TCYC, *Teucrium divaricatum* ssp. *divaricatum*, TDYB και TDYC και *Prasium majus*, PMYC, κατ' αντιστοιχία. Τα εκχυλίσματα των οικογενειών Aristolochiaceae, Brassicaceae και Araceae δεν φάνηκε να περιέχουν σημαντικές ποσότητες φλαβονοειδών ενώ από την οικογένεια Fabaceae, μόνο τα πολικά εκχυλίσματα του είδους *Calicotome villosa*, CVYB και CVYC, παρουσίασαν αξιόλογες περιεκτικότητες (35.41 και 36.87 mg κερκετίνης/g εκχυλίσματος).

Βιολογική αξιολόγηση

Έλεγχος αντιοξειδωτικής δράσης – Μέθοδος DPPH



Εικόνα 78. % Ικανότητα εξουδετέρωσης της ελεύθερης ρίζας DPPH των ολικών εκχυλισμάτων σε συγκέντρωση 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (με εξαίρεση τα HORA, SASA, SAFA, LASA που αξιολογήθηκαν στα 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ λόγω της ελαιώδους μορφής τους). Το γαλλικό οξύ (GA) χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη αντιοξειδωτική ουσία σε συγκέντρωση 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων έγινε με τη μέθοδο του DPPH όπως έχει περιγραφεί στην αντίστοιχη ενότητα Υλικά-Μέθοδοι-Τεχνικές. Από το σύνολο των 88 εκχυλισμάτων, άπολων και πολικών, που αξιολογήθηκαν σε τελική συγκέντρωση 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (με εξαίρεση τα HORA, SASA, SAFA, LASA που αξιολογήθηκαν στα 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ λόγω της ελαιώδους μορφής τους), περίπου το 20% αυτών επέδειξε σημαντική αντιοξειδωτική δράση, μεταξύ των οποίων τα πολικά εκχυλίσματα των φυτικών ειδών *Adiantum capillus-veneris* (Pteridaceae) (ACWC: $54.79 \pm 0.56\%$), *Sternbergia lutea* (Amaryllidaceae) (άνθη, SLFC: $70.18 \pm 0.29\%$), *Convolvulus elagantissimus* (Convolvulaceae) (CEYB: $68.84 \pm 0.34\%$, CEYC: $72.44 \pm 3.30\%$) και *Cynoglossum creticum* (Boraginaceae) (CCYC: $80.48 \pm 0.74\%$). Τα πολικά εκχυλίσματα των ειδών της οικογένειας Lamiaceae παρουσίασαν τα υψηλότερα ποσοστά εξουδετέρωσης της ελεύθερης ρίζας DPPH, όπως π.χ. *Teucrium capitatum* (TCYB: $80.48 \pm 1.56\%$, TCYC: $66.97 \pm 2.56\%$), *Teucrium divaricatum* ssp. *divaricatum* (TDYB: $93.17 \pm 0.41\%$, TDYC: $88.82 \pm 0.32\%$), *Teucrium scordium* (TSYB: $69.75 \pm 2.12\%$, TSYC: $78.02 \pm 3.21\%$), *Mentha longifolia* (MLYB: $50.98 \pm 0.86\%$, MLYC: $80.25 \pm 1.96\%$). Τα εκχυλίσματα των ειδών των οικογενειών Aristolochiaceae, Brassicaceae και Araceae δεν επέδειξαν αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική δράση. Από την οικογένεια Fabaceae, τα πολικά εκχυλίσματα του είδους *Calicotome villosa* παρουσίασαν την ισχυρότερη ικανότητα εξουδετέρωσης του DPPH (CVYB: $89.42 \pm 1.25\%$, CVYC: $90.74 \pm 0.43\%$). Η αντιοξειδωτική ισχύς των ανωτέρω εκχυλισμάτων πιθανότατα οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητά τους σε φαινολικά παράγωγα.

Έλεγχος ενζυμικής αναστολής

Πίνακας 8. % Αναστολή ακετυλοχολινεστεράσης (AChE), υαλουρονιδάσης (Hyal) και εκκρινόμενης φωσφολιτάσης A₂ (sPLA₂) των ολικών εκχυλισμάτων σε συγκέντρωση 300 µg/mL

ΚΩΔΙΚΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ	% ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ AChE (±STDEV)		% ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ Hyal (±STDEV)	% ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ sPLA ₂ (±STDEV)
ALRA	-18.03 ± 3.25		0.19 ± 3.00	31.58 ± 4.22
ALRB	-1.80 ± 2.50		12.36 ± 2.93	12.95 ± 5.72
HPYA	-20.53 ± 2.40		8.86 ± 1.75	64.13 ± 0.12
HPYB	87.31 ± 1.20		22.16 ± 2.15	21.24 ± 1.20
VOWA	50.75 ± 2.93		2.89 ± 1.77	57.84 ± 2.20
VOWB	66.56 ± 3.10		4.31 ± 0.42	45.23 ± 2.30
RLYB	76.72 ± 2.21		26.70 ± 2.73	5.71 ± 4.02
POYA	-21.77 ± 3.21		7.49 ± 2.96	81.04 ± 0.58
POYB	-27.98 ± 2.56		13.96 ± 3.74	76.33 ± 2.07
ACWB	62.96 ± 2.65		26.15 ± 3.23	ΔΕ
ACWC	88.16 ± 0.10	41.18 ± 0.82	8.32 ± 1.29	7.26 ± 3.56
IGRB	-16.52 ± 0.65		-31.24 ± 3.74	ΔΕ
IGRC	-26.09 ± 2.03		15.22 ± 2.17	ΔΕ
HORA	8.97 ± 3.93		ΔΕ	ΔΕ
HORB	13.70 ± 2.83		8.05 ± 1.09	ΔΕ
HORC	18.25 ± 0.30		-3.09 ± 5.90	ΔΕ
SASB	2.70 ± 1.35		19.79 ± 3.04	ΔΕ
SASC	7.08 ± 1.12		1.26 ± 1.71	ΔΕ
SAFB	13.29 ± 1.55		ΔΕ	ΔΕ
PPRB	70.25 ± 3.36	-	ΔΕ	ΔΕ
PPRC	75.71 ± 1.02	40.07 ± 1.36	33.56 ± 0.69	49.19 ± 2.14
PprE5	-18.77 ± 0.59		ΔΕ	ΔΕ
PprE10	-2.11 ± 1.19		ΔΕ	ΔΕ
PPAC	-	42.35 ± 0.89	56.35 ± 3.10	25.13 ± 3.23
Araceae				
DVRWA	-20.60 ± 0.71		ΔΕ	ΔΕ
DVRWB	-16.38 ± 3.77		-20.67 ± 1.58	ΔΕ
DVRA	-35.15 ± 1.29		ΔΕ	ΔΕ

ΚΩΔΙΚΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ	% ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ AChE (±STDEV)		% ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ Hyal (±STDEV)	% ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ sPLA ₂ (±STDEV)
DVRB	-22.03 ± 1.74		4.47 ± 4.05	ΔΕ
DVRC	-16.63 ± 1.77		-11.33 ± 2.09	ΔΕ
AIRA	-32.25 ± 1.63		ΔΕ	ΔΕ
AIRB	-23.14 ± 2.89		6.05 ± 1.00	ΔΕ
Boraginaceae				
ACAWA	-42.17 ± 3.20	16.36 ± 1.98	1.02 ± 2.59	33.12 ± 0.33
ACAWB	93.53 ± 2.24	24.92 ± 1.43	47.44 ± 1.28	64.56 ± 3.51
AURA	74.05 ± 4.21		ΔΕ	ΔΕ
AURB	90.81 ± 0.70	50.77 ± 1.06	9.71 ± 2.88	ΔΕ
AURC	98.40 ± 0.13	3.48 ± 1.05	31.16 ± 3.20	ΔΕ
AUYA	-30.46 ± 1.94		ΔΕ	ΔΕ
AUYB	81.18 ± 2.10	5.26 ± 1.29	58.99 ± 0.84	ΔΕ
AUYC	95.94 ± 2.34	3.86 ± 0.85	55.49 ± 2.78	ΔΕ
EAYA	-1.30 ± 2.21	11.58 ± 1.97	0.71 ± 2.49	59.17 ± 0.15
EAYB	66.49 ± 2.05	17.15 ± 1.23	13.17 ± 0.65	81.69 ± 3.21
EPRA	68.21 ± 0.04%		ΔΕ	ΔΕ
EPRB	90.23 ± 1.64	0.22 ± 2.32	63.99 ± 2.42	ΔΕ
EPRC	97.04 ± 0.36	11.21 ± 0.91	95.17 ± 0.39	ΔΕ
EPYA	-29.48 ± 2.94		ΔΕ	ΔΕ
EPYB	-12.31 ± 5.51	3.07 ± 1.61	2.24 ± 1.01	ΔΕ
EPYC	67.75 ± 0.14	-6.49 ± 1.79	-4.32 ± 4.95	ΔΕ
Asteraceae				
IPYA	36.61 ± 1.23		15.69 ± 3.06	29.77 ± 2.21
IPYB	85.77 ± 1.01		32.10 ± 3.66	37.80 ± 3.14
IVYA	-48.18 ± 3.21		1.28 ± 4.51	53.35 ± 1.09
IVYB	72.00 ± 1.03		30.09 ± 4.00	57.52 ± 1.21
CCOYA	7.65 ± 2.13		-16.57 ± 0.43	54.43 ± 0.03
CCOYB	43.73 ± 2.16		-12.62 ± 1.18	30.22 ± 2.35
CSYA	10.05 ± 2.23		-7.31 ± 1.91	83.27 ± 4.01
CSYB	62.21 ± 3.21		5.20 ± 3.17	81.88 ± 1.38
Aristolochiaceae				
AHRB	-16.90 ± 0.25		14.64 ± 1.78	ΔΕ

ΚΩΔΙΚΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ	% ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ AChE (±STDEV)	% ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ Hyal (±STDEV)	% ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ sPLA ₂ (±STDEV)
AHRC	21.39 ± 1.87	12.65 ± 0.63	-2.93 ± 4.05
AHFB	-18.68 ± 1.10	8.46 ± 4.00	ΔΕ
AHYB	30.99 ± 3.07	15.45 ± 2.32	ΔΕ
AHYC	96.77 ± 0.19	5.75 ± 2.17	3.76 ± 5.21
AMRB	-2.54 ± 5.20	ΔΕ	ΔΕ
AMRC	-7.88 ± 2.93	7.19 ± 3.24	-16.83 ± 1.93
AERB	-9.58 ± 1.37	ΔΕ	ΔΕ
AERC	10.44 ± 1.01	-37.23 ± 3.44	-18.58 ± 5.31
Fabaceae			
SMB	-25.10 ± 1.85	10.71 ± 0.59	ΔΕ
SMC	12.05 ± 2.34	9.29 ± 3.40	ΔΕ
OVWB	27.58 ± 2.39	5.45 ± 2.91	ΔΕ
OVWC	33.22 ± 2.21	9.94 ± 4.16	ΔΕ
MGWA	-16.11 ± 1.13	9.35 ± 1.20	67.91 ± 2.05
MGWB	-14.64 ± 3.75	3.15 ± 2.25	70.56 ± 5.68
Lamiaceae			
MVYA	23.63 ± 1.21	-14.60 ± 3.27	36.44 ± 1.96
MVYB	87.25 ± 2.50	-15.54 ± 2.53	41.19 ± 5.28
MVYB	72.20 ± 1.79	2.07 ± 4.03	ΔΕ
MVYC	87.57 ± 0.43	11.96 ± 3.01	ΔΕ
MLYB	92.69 ± 0.82	12.39 ± 1.03	ΔΕ
MLYC	96.56 ± 0.16	12.21 ± 3.41	ΔΕ
TDYB	ΔΕ	5.77 ± 1.90	ΔΕ
TDYC	26.48 ± 1.38	17.03 ± 2.77	22.33 ± 1.14
TCYB	ΔΕ	-25.80 ± 2.07	ΔΕ
TCYC	ΔΕ	15.30 ± 0.84	ΔΕ
TSYB	ΔΕ	-36.27 ± 1.52	ΔΕ
TSYC	ΔΕ	22.47 ± 176	ΔΕ
VASA	16.33 ± 3.21	-3.91 ± 1.29	40.58 ± 5.11
VASB	8.01 ± 1.23	11.95 ± 0.94	28.84 ± 4.91
STYA	ΔΕ	17.63 ± 2.39	ΔΕ
STYB	95.63 ± 2.10	37.35 ± 1.56	28.92 ± 5.23

ΚΩΔΙΚΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ	% ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ AChE (±STDEV)	% ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ Hyal (±STDEV)	% ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ sPLA ₂ (±STDEV)
ΟΝΟΥΥΒ	91.69 ± 1.21	81.04 ± 1.00	51.84 ± 4.19

*ΔΕ: δεν ελέγχθηκε

Τα εκχυλίσματα των φυτικών ειδών που προήλθαν από τη λίστα των *Θηριακών* αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τα υδρολυτικά ένζυμα της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE), της υαλουρονιδάσης (Hyal) και της εκκρινόμενης φωσφολιπάσης A₂ (sPLA₂) σε συγκέντρωση 300 µg/mL. Οι μέθοδοι που ακολουθήθηκαν αναλύονται εκτενώς στις αντίστοιχες παραγράφους της ενότητας Υλικά-Μέθοδοι-Τεχνικές και επισημαίνεται ότι στην περίπτωση της AChE εφαρμόστηκε η μέθοδος NA-FBB για όλα τα εκχυλίσματα, ενώ τα πιο ενδιαφέροντα ελέγχθηκαν και με τη μέθοδο Ellman's. Τα εκχυλίσματα του οξικού αιθυλεστέρα παρουσίασαν προβλήματα διαλυτότητας ενώ τα διχλωρομεθανικά εκχυλίσματα δεν ήταν διαλυτά στα ρυθμιστικά διαλύματα και τα περισσότερα δεν ελέγχθηκαν (ΔΕ). Επίσης το kit της sPLA₂ χρησιμοποιήθηκε μια μόνο φορά σε έναν πρώτο έλεγχο εκχυλισμάτων και λόγω υψηλού κόστους δεν εφαρμόστηκε ξανά παρά μόνο για τις καθαρές απομονωμένες ουσίες.

Στη δοκιμασία αναστολής της AChE με τη μέθοδο NA-FBB ελέγχθηκαν 79 εκχυλίσματα και το 39% αυτών εμφάνισε ανασταλτική δράση μεγαλύτερη του 60%. Από τον παραπάνω πίνακα συμπεραίνεται ότι τα πολικά εκχυλίσματα του είδους *Adiantum capillus-veneris* (Pteridaceae), ACWB και ACWC, παρουσίασαν αξιοσημείωτη αναστολή της AChE με ποσοστά 62.96 ± 2.65% και 88.16 ± 0.10% (μέθοδος NA-FBB), ενώ το ACWC εμφάνισε 41.18 ± 0.82% αναστολή της AChE στη μέθοδο Ellman's. Το μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του *Hypericum perforatum* (Hypericaceae) εμφάνισε σημαντική αναστολή της AChE σε ποσοστό 87.31 ± 1.20%. Τα μεθανολικά εκχυλίσματα ολόκληρου του φυτού *Verbena officinalis* (Verbenaceae), VOWB, και των υπέργειων τμημάτων του *Rhamnus lycioides* (Rhamnaceae), RLYB, εμφάνισαν ποσοστά αναστολής 66.56 ± 3.10% και 76.72 ± 2.21% αντιστοίχως. Τα εκχυλίσματα του είδους *Paeonia parnassica* (Paeoniaceae) και συγκεκριμένα το μεθανολικό και υδατομεθανολικό εκχύλισμα των ριζών, PPRB και PPRC, εμφάνισαν αξιοσημείωτη αναστολή της AChE τόσο με τη μέθοδο NA-FBB, με ποσοστά 70.25 ± 3.36% και 75.71 ± 1.02%, όσο και με τη μέθοδο Ellman's (PPRC: 40.07 ± 1.36%). Ομοίως και το υδατομεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του φυτού το οποίο ελέγχθηκε μόνο με τη μέθοδο Ellman's και επέδειξε 42.35 ± 0.89% αναστολή της AChE, ενώ τα εκχυλίσματα της SFE (PprE5 και PprE10) ήταν μη δραστικά. Από την οικογένεια

Boraginaceae τα πολικά εκχυλίσματα ολόκληρου του φυτού του είδους *Anchusa caespitosa*, ACAWB, των ριζών και των υπέργειων τμημάτων του είδους *Anchusa undulata* ssp. *hybrida*, AURB, AURC, AUYB, AUYC επέδειξαν $93.53 \pm 2.24\%$, $90.81 \pm 0.70\%$, $98.40 \pm 0.13\%$, $81.18 \pm 2.10\%$, $95.94 \pm 2.34\%$ αναστολή της AChE αντίστοιχα, ενώ μόνο το εκχύλισμα AURB εμφάνισε σημαντική αναστολή της AChE ($50.77 \pm 1.06\%$) και στη μέθοδο Ellman's. Το μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του *Echium angustifolium* (EAYB) και το υδατομεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του *Echium plantagineum* (EPYC) παρουσίασαν αναστολή της AChE με ποσοστά $66.49 \pm 2.05\%$ και $67.75 \pm 0.14\%$, αντίστοιχα, ενώ ισχυρότερη δράση εμφάνισαν τα πολικά εκχυλίσματα των ριζών του *Echium plantagineum*, EPRB και EPRC, τα οποία ανέστειλαν την AChE κατά $90.23 \pm 1.64\%$ και $97.04 \pm 0.36\%$ (Μέθοδος NA-FBB). Σημειώνεται επίσης ότι τα διχλωρομεθανικά εκχυλίσματα των ριζών των ειδών *Anchusa undulata* ssp. *hybrida* και *Echium plantagineum* εμφάνισαν υψηλά ποσοστά αναστολής της AChE στη μέθοδο NA-FBB, $74.05 \pm 4.21\%$ και $68.21 \pm 0.04\%$, αντίστοιχα. Από την οικογένεια Asteraceae τα μεθανολικά εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων των ειδών *Inula pseudolimonella*, IPYB, *Inula verbascifolia* ssp. *menthanaea*, IVYB, *Carlina corymbosa*, CCOYB, και *Chrysanthemum segetum*, CSYB εμφάνισαν σημαντικές δράσεις (μέθοδος NA-FBB) με τα εξής αντίστοιχα ποσοστά ενζυμικής αναστολής, $85.77 \pm 1.01\%$, $72.00 \pm 1.03\%$, $43.73 \pm 2.16\%$ και $62.21 \pm 3.21\%$. Μεταξύ των εκχυλισμάτων του γένους *Aristolochia*, μόνο το υδατομεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων της *A. hirta* (AHYC) παρουσίασε ισχυρή αναστολή της AChE (μέθοδος NA-FBB), με ποσοστό $96.77 \pm 0.19\%$, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα μη δραστικά εκχυλίσματα των ριζών των *A. hirta*, *A. microstoma* και *A. elongata*. Τα εκχυλίσματα της οικογένειας Lamiaceae επέδειξαν σημαντικές δράσεις στη δοκιμασία αναστολής της AChE με τη μέθοδο NA-FBB και συγκεκριμένα το μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (OVUYB: $91.69 \pm 1.21\%$), το μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων της *Satureja thymbra* (STYB: $95.63 \pm 2.10\%$), το αιθανολικό και το υδατοαιθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων της *Mentha longifolia* (MLYB: 92.69 ± 0.82 και MLYC: 96.56 ± 0.16), το αιθανολικό και το υδατοαιθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του *Marrubium vulgare* (MVYB: $72.20 \pm 1.79\%$ και MVYC: 87.57 ± 0.43) και το μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του *Marrubium velutinum* ssp. *velutinum* (MVVYB: $87.25 \pm 2.50\%$). Τα εκχυλίσματα των οικογενειών Fabaceae δεν επέδειξαν σημαντική δράση στην AChE.

Στη δοκιμασία αναστολής της Hyal από τα 73 εκχυλίσματα που ελέγχθηκαν ποσοστό 8% εμφάνισε δράση πάνω από 50%. Το υδατομεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του

είδους *Paeonia parnassica* ανέστειλε τη δράση της Hyal κατά $56.35 \pm 3.10\%$. Αξιοσημείωτες είναι οι δράσεις που επέδειξαν τα πολικά εκχυλίσματα της οικογένειας Boraginaceae και συγκεκριμένα ολόκληρου του φυτού *Anchusa caespitosa*, ACAWB, των υπέργειων τμημάτων της *Anchusa undulata* ssp. *hybrida*, AUYB και AUYC, των ριζών του *Echium plantagineum*, EPRB και EPRC, με αντίστοιχα ποσοστά αναστολής $47.44 \pm 1.28\%$, $58.99 \pm 0.84\%$, $55.49 \pm 2.78\%$, $63.99 \pm 2.42\%$ και $95.17 \pm 0.39\%$. Με βάση τα προαναφερόμενα, είναι δυνατό να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι στο γένος *Anchusa* η ανασταλτική επί της Hyal δράση εντοπίζεται στα υπέργεια τμήματα, ενώ στο γένος *Echium* στη ρίζα. Από τα εκχυλίσματα της οικογένειας Lamiales μόνο το μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (OVUYB) επέδειξε υψηλό ποσοστό ($81.04 \pm 1.00\%$) αναστολής της Hyal. Εκχυλίσματα των οικογενειών Asteraceae, Aristolochiaceae, Fabaceae δεν επέδειξαν σημαντική δράση.

Στη δοκιμασία αναστολής της sPLA₂ ελέγχθηκαν 37 εκχυλίσματα από τα οποία τα εκχυλίσματα του οξικού αιθυλεστέρα και της μεθανόλης ολόκληρου του φυτού του *Melilotus graecus* (Fabaceae) σημείωσαν σημαντική αναστολή με ποσοστά $67.91 \pm 2.05\%$ και $70.56 \pm 5.68\%$. Ομοίως τα αντίστοιχα εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων του είδους *Portulaca oleracea* (Portulacaceae) εμφάνισαν αναστολή $81.04 \pm 0.58\%$ και $76.33 \pm 2.07\%$. Τα μεθανολικά εκχυλίσματα των ειδών *Anchusa caespitosa* (ACAWB) και *Echium angustifolium* (EAYB) παρουσίασαν ικανοποιητική αναστολή του ενζύμου με αντίστοιχα ποσοστά $64.56 \pm 3.51\%$ και $81.69 \pm 3.21\%$. Από την οικογένεια Asteraceae ποσοστά αναστολής >50% σημείωσαν τα εκχυλίσματα των ειδών *Inula verbascifolia* ssp. *menthanaea*, *Carlina corymbosa* και *Chrysanthemum segetum* με υψηλότερες τις τιμές των εκχυλισμάτων οξικού αιθυλεστέρα και μεθανόλης του είδους *Chrysanthemum segetum* (CSYA: $83.27 \pm 4.01\%$ και CSYC: $81.88 \pm 1.38\%$). Από την οικογένεια Lamiales το μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του είδους *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (OVUYB) επέδειξε αναστολή $51.84 \pm 4.19\%$. Από τα πιο άπολα εκχυλίσματα, αυτό του οξικού αιθυλεστέρα του είδους *Hypericum perforatum* (Hypericaceae) (HPYA) σημείωσε αναστολή $64.13 \pm 0.12\%$. Τα εκχυλίσματα των οικογενειών Aristolochiaceae δεν παρουσίασαν σημαντική δράση.

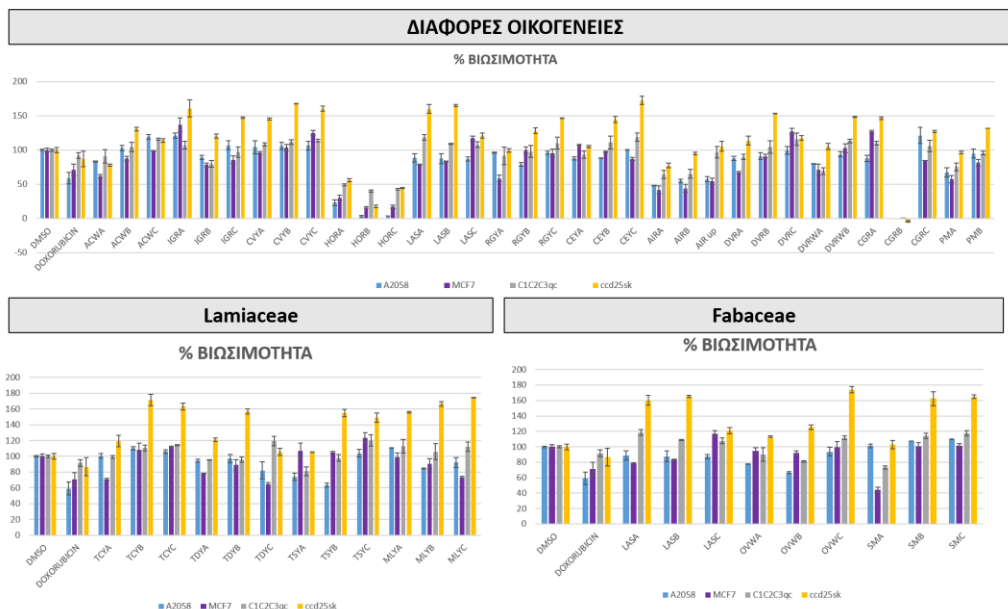
Τα εκχυλίσματα των ειδών *Asphodeline lutea* (Xanthorrhoeaceae) (ALRA, ALRB), *Iris germanica* (Iridaceae) (IGRB, IGRC), *Helleborus odorus* ssp. *cyclophyllus* (Ranunculaceae) (HORA, HORB, HORC), *Sinapis alba* (Brassicaceae) (SASB, SASC, SAFB), *Arum* spp. (Araceae) (DVR, AIR) δεν

παρουσίασαν σημαντική δράση σε κανέναν από τους στόχους στους οποίους δοκιμάστηκαν στα 300 µg/mL.

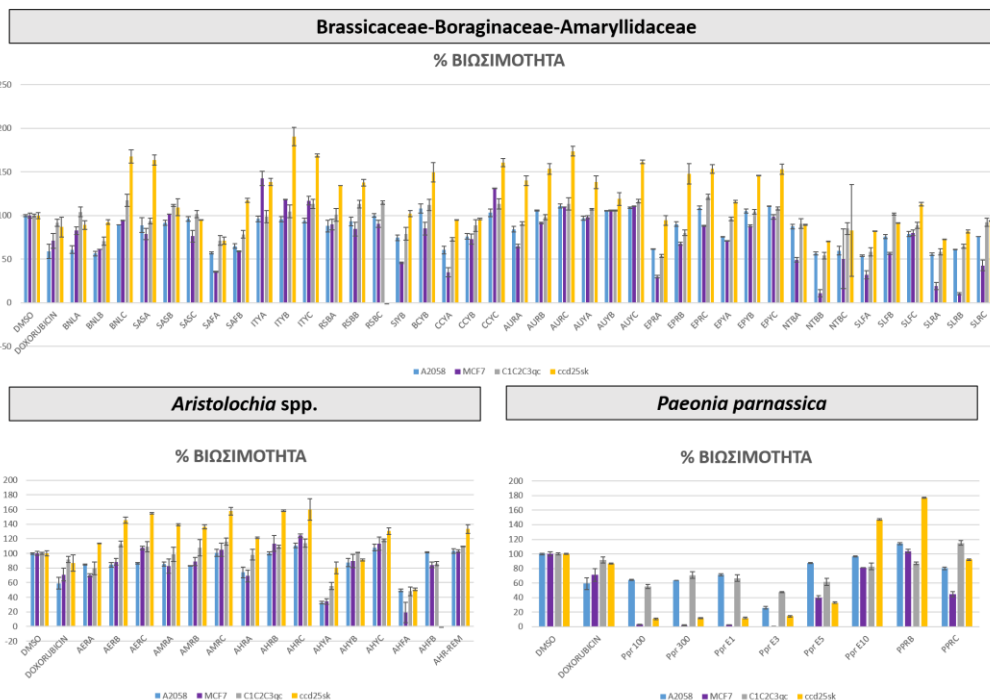
Τέλος στα πλαίσια μιας προσπάθειας εκτέλεσης των θεραπευτικών συνταγών του Νικάνδρου ενάντια των δηγμάτων από δηλητηριώδη ερπετά και με βάση συγκεκριμένους στίχους πραγματοποιήθηκαν οι εξής δοκιμές: (α) (στίχοι 625-629) ανάμειξη 50:50 (150 µg/mL:150 µg/mL) των μεθανολικών εκχυλισμάτων των υπέργειων τμημάτων των ειδών *Satureja thymbra* (STYB) και *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (OVUYB) και οι έλεγχοι της ικανότητας αναστολής των AChE, Hyal και sPLA₂ έδειξαν αναστολές $94.68 \pm 2.45\%$, $60.61 \pm 1.52\%$ και $13.76 \pm 3.56\%$ αντίστοιχα και (β) (στίχοι 860-862) ανάμειξη 50:50 (150 µg/mL:150 µg/mL) των μεθανολικών εκχυλισμάτων ολόκληρου του φυτού του *Verbena officinalis* (VOWB) και των υπέργειων τμημάτων του *Rhamnus lycioides* (RLYB) και η βιολογική αξιολόγηση επέδειξε αντίστοιχα ικανότητα αναστολής στην AChE, Hyal και sPLA₂ $71.13 \pm 3.21\%$, $6.98 \pm 3.90\%$ και $-1.54 \pm 3.25\%$. Στην πρώτη περίπτωση μετά την ανάμειξη των εκχυλισμάτων διατηρούνται τα υψηλά ποσοστά αναστολής τόσο της AChE όσο και της Hyal που εμφάνισαν και τα μεμονωμένα δείγματα και ομοίως στη δεύτερη περίπτωση διατηρείται η δράση στην AChE.

Έλεγχος κυτταροτοξικότητας

Παρακάτω παρουσιάζονται υπό μορφή ραβδογραμμάτων και αναλύονται εν συνεχεία τα αποτελέσματα των ολικών εκχυλισμάτων στις δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας στις τρεις καρκινικές σειρές A2058, MCF7, C1C2C3qc και στη φυσιολογική σειρά CCD-25Sk. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % βιωσιμότητα σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα, δηλαδή την ομάδα των κυττάρων που επώαστηκαν με 0.2% DMSO. Όλα τα εκχυλίσματα αξιολογήθηκαν σε τελική συγκέντρωση 250 µg/mL. Εμφανίζονται τα αποτελέσματα επώασης εκχυλίσματος-κυττάρων μετά από 24 ώρες και 72 ώρες.



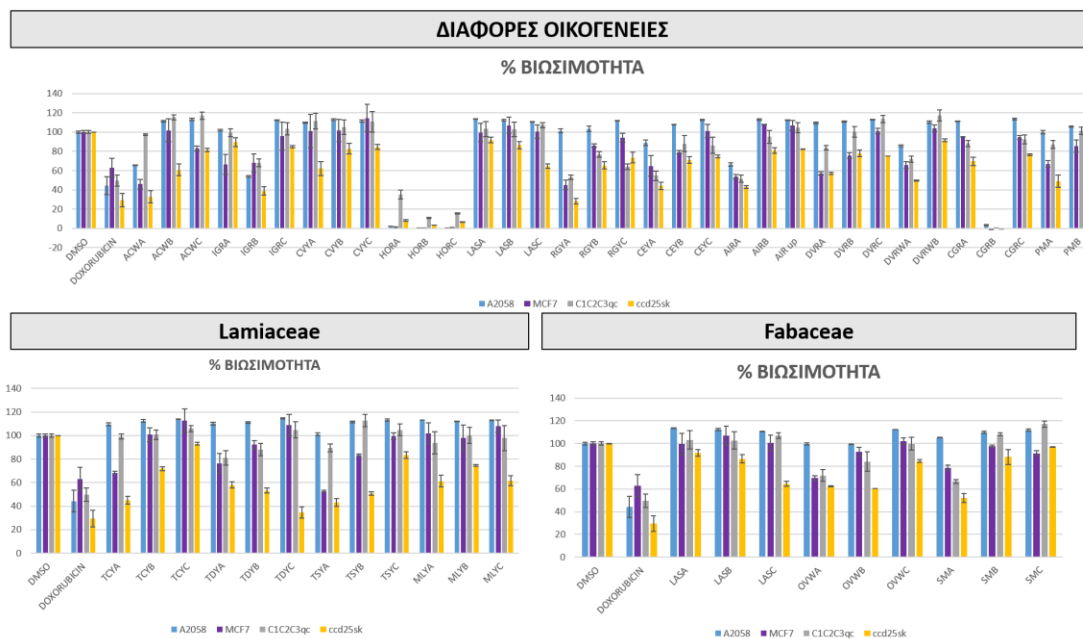
Εικόνα 79. Επίδραση εκχυλισμάτων στη βιωσιμότητα των κυττάρων A2058, MCF7, C1C2C3qc και CCD-25Sk συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα, δηλαδή την ομάδα των κυττάρων που επωάστηκαν με 0,2% DMSO. Τα κύτταρα επωάστηκαν με τα εκχυλίσματα (συγκέντρωση 250μg/mL) για 24 ώρες προτού εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. Οι αριθμοί των κυττάρων παρουσιάζονται ως % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± SEM. Ως πρότυπη ουσία χρησιμοποιήθηκε η δοξορουβικίνη.



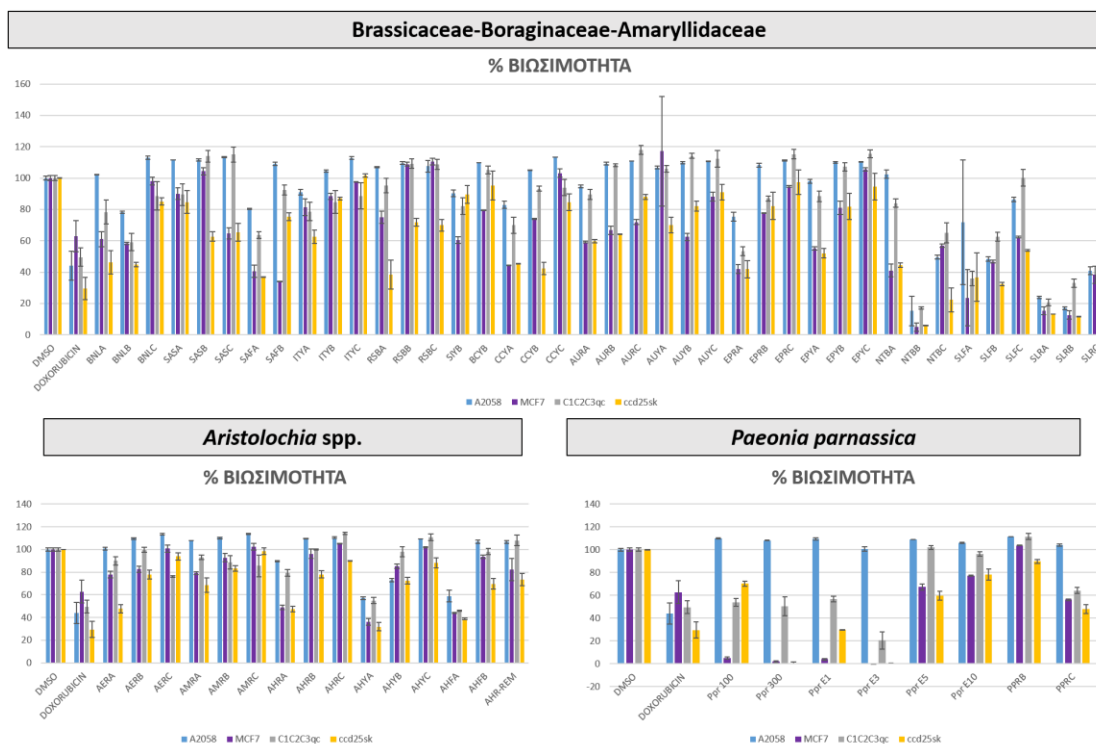
Εικόνα 80. Επίδραση εκχυλισμάτων στη βιωσιμότητα των κυττάρων A2058, MCF7, C1C2C3qc και CCD-25Sk συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα, δηλαδή την ομάδα των κυττάρων που επωάστηκαν με 0,2% DMSO. Τα κύτταρα επωάστηκαν με τα εκχυλίσματα (συγκέντρωση 250μg/mL) για 24 ώρες προτού εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. Οι αριθμοί των κυττάρων παρουσιάζονται ως % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± SEM. Ως πρότυπη ουσία χρησιμοποιήθηκε η δοξορουβικίνη.

Εκχυλίσματα των φυτικών ειδών *Narcissus tazetta*, *Sternbergia lutea*, *Helleborus odoratus*, *Arum italicum*, *Sinapis alba*, *Paeonia parnassica* και *Aristolochia sp.* επέδειξαν την ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση. Στις 24 ώρες η % βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων A2058, MCF7 και C1C2C3qc, υπό την επίδραση δοξορουβικίνης, είναι $59 \pm 8\%$, $71 \pm 9\%$ και $92 \pm 4\%$, ενώ η % βιωσιμότητα των φυσιολογικών κυττάρων CCD-25Sk, υπό την επίδραση δοξορουβικίνης, είναι $87 \pm 11\%$. Στην περίπτωση των εκχυλισμάτων του *Narcissus tazetta*, NTBA, NTBB και NTBC, η % βιωσιμότητα (στις 24 ώρες) των καρκινικών κυττάρων A2058, MCF7 και C1C2C3qc ήταν $57 \pm 2\%$ (NTBB, A2058), $60 \pm 5\%$ (NTBC, A2058), $49 \pm 3\%$ (NTBA, MCF7), $11 \pm 4\%$ (NTBB, MCF7), $50 \pm 34\%$ (NTBC, MCF7), $91 \pm 6\%$ (NTBA, C1C2C3qc), $54 \pm 4\%$ (NTBB, C1C2C3qc) και $85 \pm 7\%$ (NTBC, C1C2C3qc), ενώ η % βιωσιμότητα στη φυσιολογική σειρά CCD-25Sk ήταν $90 \pm 1\%$, $71 \pm 0\%$ και $83 \pm 53\%$, αντίστοιχα. Στην περίπτωση των εκχυλισμάτων της *Sternbergia lutea*, SLFA, SLFB, SLFC, SLRA, SLRB, SLRC, η % βιωσιμότητα (στις 24 ώρες) των καρκινικών κυττάρων A2058, MCF7 και C1C2C3qc ήταν $54 \pm 1\%$ (SLFA, A2058), $56 \pm 2\%$ (SLRA, A2058), $32 \pm 5\%$ (SLFA, MCF7), $56 \pm 1\%$ (SLFB, MCF7), $19 \pm 4\%$ (SLRA, MCF7), $11 \pm 1\%$ (SLRB, MCF7), $43 \pm 6\%$ (SLRC, MCF7), $59 \pm 5\%$ (SLFA, C1C2C3qc), $89 \pm 3\%$ (SLFB, C1C2C3qc), $58 \pm 4\%$ (SLRA, C1C2C3qc), $65 \pm 2\%$ (SLRB, C1C2C3qc), $92 \pm 4\%$ (SLRC, C1C2C3qc), ενώ η % βιωσιμότητα στη φυσιολογική σειρά CCD-25Sk ήταν $82 \pm 0\%$, $91 \pm 0\%$, $113 \pm 2\%$, $73 \pm 0\%$, $82 \pm 2\%$ και $94 \pm 0\%$, αντίστοιχα. Στην περίπτωση των εκχυλισμάτων του *Helleborus odoratus*, HORA, HORB και HORC, η % βιωσιμότητα (στις 24 ώρες) των καρκινικών κυττάρων A2058, MCF7 και C1C2C3qc ήταν $23 \pm 4\%$, $3 \pm 1\%$, $4 \pm 0\%$, $30 \pm 4\%$, $16 \pm 1\%$, $17 \pm 2\%$, $49 \pm 2\%$, $40 \pm 1\%$ και $42 \pm 1\%$, ενώ εμφάνισαν υψηλή τοξικότητα και στη φυσιολογική σειρά CCD-25Sk (% βιωσιμότητα (στις 24 ώρες) $56 \pm 2\%$, $18 \pm 2\%$, $44 \pm 1\%$, αντίστοιχα). Στην περίπτωση των εκχυλισμάτων των ριζών του *Arum italicum*, AIRA και AIRB, η % βιωσιμότητα (στις 24 ώρες) των καρκινικών κυττάρων A2058, MCF7 και C1C2C3qc ήταν $48 \pm 1\%$, $55 \pm 2\%$, $42 \pm 6\%$, $44 \pm 5\%$, $64 \pm 6\%$, $65 \pm 6\%$, ενώ στη φυσιολογική σειρά CCD-25Sk η % βιωσιμότητα ήταν $78 \pm 3\%$ και $95 \pm 2\%$. Στην περίπτωση των εκχυλισμάτων του *Sinapis alba*, η % βιωσιμότητα (στις 24 ώρες) υπό την επίδραση των εκχυλισμάτων SAFA και SAFB, στα καρκινικά κύτταρα A2058, MCF7 και C1C2C3qc ήταν $57 \pm 1\%$, $65 \pm 3\%$, $35 \pm 1\%$, $59 \pm 0\%$, $71 \pm 6\%$, $78 \pm 4\%$, ενώ η % βιωσιμότητα των φυσιολογικών κυττάρων CCD-25Sk ήταν $71 \pm 4\%$ και $118 \pm 2\%$, αντίστοιχα. Στην περίπτωση των εκχυλισμάτων της *Paeonia parnassica*, η % βιωσιμότητα (στις 24 ώρες) υπό την επίδραση των εκχυλισμάτων που παραλήφθηκαν με υπερκρίσιμη εκχύλιση, Ppr100, Ppr300, PprE1, PprE3, PprE5 και PprE10, για τα MCF7 κύτταρα είναι $3 \pm 0\%$, $2 \pm 1\%$, $3 \pm 0\%$, $0 \pm 0\%$, $40 \pm 2\%$ ενώ για τα C1C2C3qc κύτταρα είναι $55 \pm 3\%$, $71 \pm 5\%$, $67 \pm 5\%$, $48 \pm 1\%$, $62 \pm 5\%$, $83 \pm 4\%$. Ωστόσο χαμηλές

τιμές βιωσιμότητας παρατηρήθηκαν και στη φυσιολογική σειρά CCD-25Sk ($11 \pm 0\%$, $12 \pm 1\%$, $12 \pm 1\%$, $14 \pm 0\%$, $33 \pm 1\%$, $147 \pm 1\%$). Η % βιωσιμότητα, υπό την επίδραση των εκχυλισμάτων των ριζών της *Raeonia parnassica*, PPRB στα C1C2C3qc κύτταρα και PPRC στα MCF7 κύτταρα, ήταν $87 \pm 2\%$ και $45 \pm 3\%$, ενώ η % βιωσιμότητα στα CCD-25Sk φυσιολογικά κύτταρα ήταν $177 \pm 2\%$ και $92 \pm 1\%$. Στην περίπτωση των εκχυλισμάτων της *Aristolochia*, το AERA (άπολο εκχύλισμα ριζών *A. elongata*) εμφάνισε % βιωσιμότητα (στις 24 ώρες) των καρκινικών MCF7, $70 \pm 2\%$ και των C1C2C3qc, $79 \pm 9\%$, ενώ στα φυσιολογικά κύτταρα CCD-25Sk η % βιωσιμότητα ήταν $114 \pm 0\%$. Η % βιωσιμότητα (στις 24 ώρες) υπό την επίδραση των εκχυλισμάτων της *Aristolochia hirta*, ήταν $69 \pm 8\%$ (AHRA, MCF7), $121 \pm 1\%$ (AHRA, CCD-25Sk), $33 \pm 2\%$ (AHYA, A2058), $34 \pm 4\%$ (AHYA, MCF7), $55 \pm 5\%$ (AHYA, C1C2C3qc), $80 \pm 8\%$ (AHYA, CCD-25Sk), $49 \pm 2\%$ (AHFA, A2058), $19 \pm 14\%$ (AHFA, MCF7), $48 \pm 6\%$ (AHFA, C1C2C3qc), $51 \pm 2\%$ (AHFA, CCD-25Sk), $86 \pm 3\%$ (AHFB, C1C2C3qc), ενώ το εκχύλισμα AHFB εμφάνισε ισχυρή τοξικότητα στη φυσιολογική σειρά CCD-25Sk.



Εικόνα 81. Επίδραση εκχυλισμάτων στη βιωσιμότητα των κυττάρων A2058, MCF7, C1C2C3qc και CCD-25Sk συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα, δηλαδή την ομάδα των κυττάρων που επώαστηκαν με 0,2% DMSO. Τα κύτταρα επώαστηκαν με τα εκχυλίσματα (συγκέντρωση 250μg/mL) για 72 ώρες προτού εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. Οι αριθμοί των κυττάρων παρουσιάζονται ως % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή \pm SEM. Ως πρότυπη ουσία χρησιμοποιήθηκε η δοξορουβικίνη.



Εικόνα 82. Επίδραση εκχυλισμάτων στη βιωσιμότητα των κυττάρων A2058, MCF7, C1C2C3qc και CCD-25Sk συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα, δηλαδή την ομάδα των κυττάρων που επωάστηκαν με 0,2% DMSO. Τα κύτταρα επωάστηκαν με τα εκχυλίσματα (συγκέντρωση 250μg/mL) για 72 ώρες προτού εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. Οι αριθμοί των κυττάρων παρουσιάζονται ως % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± SEM. Ως πρότυπη ουσία χρησιμοποιήθηκε η δοξορουβικίνη.

Στη μέτρηση του κυτταρικού αριθμού των 72 ωρών τα εκχυλίσματα που εμφάνισαν τις υψηλότερες τιμές κυτταροτοξικότητας ήταν τα ίδια με αυτά της μέτρησης των 24 ωρών. Σε σύγκριση με τη % βιωσιμότητα, υπό την επίδραση της δοξορουβικίνης, στις τρεις καρκινικές σειρές, υψηλότερη τοξικότητα εμφανίζουν τα εκχυλίσματα των *Narcissus tazetta* (NTBA στα MCF7, NTBB και στις τρεις σειρές, NTBC στα MCF7), *Sternbergia lutea* (SLFA στα MCF7 και στα C1C2C3qc, SLFB και SLFC στα MCF7, SLRA, SLRB και SLRC και στις τρεις σειρές), *Helleborus odoratus* (HORA, HORB, HORB και στις τρεις σειρές), *Arum italicum* (AIRA στα MCF7), *Sinapis alba* (SAFA και SAFB στα MCF7), *Paeonia parnassica* (Ppr100, Ppr300, PprE1, PprE3, PprE5 στα MCF7 και PprE3 στα C1C2C3qc) και *Aristolochia hirta* (AHRA στα MCF7, AHYA στα MCF7 και C1C2C3qc, AHFA στα MCF7 και C1C2C3qc).

10 *Aristolochia hirta* (Aristolochiaceae)

10.1 Σκοπός

Η μακρόχρονη παραδοσιακή χρήση της αριστολόχιας έναντι διαφόρων κακοηθειών αλλά και ως αντίδοτο σε δηγήματα όφειν σε συνδυασμό με το ενδιαφέρον φορτίο δευτερογενών μεταβολιτών αποτέλεσαν τους λόγους επιλογής της προς περαιτέρω φυτοχημική διερεύνηση και βιολογική αξιολόγηση. Στα πλαίσια αυτής της προσπάθειας θεωρήθηκε απαραίτητη η συλλογή διαφορετικών φυτικών τμημάτων π.χ. ρίζες, υπέργεια, άνθη και ειδών αριστολόχιας προκειμένου να γίνει δυνατή η σύγκριση φορτίου και δράσης και να μελετηθούν τα δραστικότερα και πλουσιότερα σε μεταβολίτες εκχυλίσματα. Η εύρεση των υπεύθυνων για τη δράση ουσιών μέσω FCPC κλασμάτωσης του εκχυλίσματος και απομόνωσης των περιεχόμενων ουσιών αποτέλεσαν τον ένα τρόπο επεξεργασίας εκχυλίσματος. Επιπροσθέτως κρίθηκε σκόπιμο να εφαρμοστεί το στατιστικό μοντέλο HetCA, το οποίο επιτρέπει την επεξεργασία των φασματοσκοπικών και βιολογικών δεδομένων των κλασμάτων, προκειμένου να αναδειχθούν οι δραστικοί μεταβολίτες χωρίς να είναι απαραίτητη η απομόνωσή τους. Στην παρούσα διατριβή η HetCA επεξεργασία εκχυλισμάτων διερευνήθηκε και αξιολογήθηκε ως προς τη χρησιμότητα και την ακρίβεια της σε σύγκριση με την κλασική φυτοχημική προσέγγιση στα πλαίσια εθνοφαρμακολογικών μελετών.

10.2 Θεωρητικό Μέρος

10.2.1 Αναφορές της δρόγης στα υπό μελέτη κείμενα

Ο Νίκανδρος αναφέρει στους στίχους 509-519 των *Θηριακών* τη χρήση της αριστολόχιας (προτείνει να ξεριζωθεί το φυτό) για την αντιμετώπιση δηγήματος που προέρχεται από οχιά και έχιδνα (Εικόνα 83).

Νικανδρος Αρχαίο Κείμενο 509-519

Ἦτοι ἀριστολόχεια παλίσκιος ἐνδατέιτο,
φύλλ' ἄτε κισσῆεντα περικλυμένοιο φέρουσα·
ἄνθεα δ' ὕσινω ἐνερεῦθετα, ἡ δέ οἱ ὁδμή
σκίδναται ἐμβαρύθουσα, μέσον δ' ὡς ἀγράδα καρπὸν
μυρτάδος ἐξ ὄχνης ἐπόψεαι ἡ σὺ γε βάκχης
ρίζα δὲ θηλυτέρης μὲν ἐπιστρογγύλλεται ὄγκω,
ἄρσενι δ' αὖ δολιχὴ τε καὶ ἄμ πυγόνος βάθος ἴσχει,
πύξου δὲ χροίῃ προσαλίγκιος Ὀρικόιο
τὴν ἦτοι ἔχιός τε καὶ αἰνοπλήγος ἐχίδνης
ἀγρεύσεις ὄφελος περιώσιον· ἔνθεν ἀπορρώξ
δραγμαίῃ μίσαγοιτο ποτῶ ἔνι κισσάδος οἴνης.

Νικανδρος Μετάφραση 509-519

Τὴν **αριστολόχεια** μάζευε, που ἀγαπᾷ σε μέρη σκιερά να φυτρῶνει
καὶ ἔχει τα φύλλα κισσοειδή, καθὼς καὶ το κυκλάμινο·
κοκκινωπά τα ἄνθη τῆς με τοῦ υσίνου μοιάζουν, καὶ τὸν καρπὸ τῆς
θα τὸν δεῖς στὴ μέση να φυτρῶνει, σαν τῆς ἀγρίας ἀχλαδιάς,
πόχει ονόματα πολλὰ· μυρτάδα, ὄχνη ἢ καὶ βάκχη πολλοὶ τὴν ὀνομάζουν·
τῆς θηλυκῆς ἡ ρίζα ἔχει ἓνα σχῆμα στρόγγυλο, τοῦ ἀρσενικοῦ ἀντίθετα
εἶναι μακριὰ καὶ προχωράει σε βάθος, στὸ μήκος ἐνὸς πήχου·
το χρῶμα τῆς παρόμοιο με τοῦ Ὀρικού πύξου.
Ἐρίξωσέ τῆνε λουπὸν, καὶ θα ἔχεις φάρμακο σωτήριο
ἐνάντια στὶς οσχίς καὶ τὸ φοβερό τῆς ἐχίδνας χτύπημα.
Ἐπειτα, στὸ βάρος μιάς δραχμῆς, με οἶνο λευκὸ ἀνάμειξέ τῆν.

Εικόνα 83. Απόσπασμα Θηριακῶν όπου αναφέρεται ἡ θεραπευτικὴ χρῆση τῆς αριστολόχειας ἐναντι δηλητηριωδῶν δηγμάτων

Ἡ χρῆση τῆς ρίζας τοῦ ἴδιου φυτοῦ ἀναφέρεται ἐπίσης καὶ στα χειρόγραφα τοῦ Ἱερόπαιδα. Συγκεκριμένα προτείνεται ἡ εφαρμογὴ καταπλάσματος τῆς αριστολόχειας στὴν περίπτωση τοῦ ἀνθρακα (*Καταπλάττειν δε το ἔλκος δι'...αριστολοχίας*). Ὁ Διοσκουρίδης ἀναφέρει στὸ ἔργο του *Περὶ Ἱατρικῆς Ὑγῆς* (3.4, Βιβλίο 3, Παράγραφος 4) τὴ χρῆση διαφόρων εἰδῶν τοῦ γένους *Aristolochia*, τα ὁποῖα περιγράφει βοτανικά, σε ποικίλες παθολογικὲς καταστάσεις. Εἶδη αριστολόχειας, ὅπως τα *Aristolochia rotunda* καὶ *Aristolochia clematitis*, ἀναφέρονται ὡς ἀντίδοτα σε δηλητηριάσεις ὄφεων, ἐνῶ ἐντοπίζεται ἀναφορὰ γιὰ τὴ χρῆση τῆς δρόγης σε συνδυασμὸ με ἄλλα φυτικὰ εἶδη ὅπως τὸ δρακόντιο γιὰ τὴν ἀντιμετώπιση κακοηθειῶν.

10.2.2 Δρογοβοτανικὴ-Γεωγραφικὴ ἐξάπλωση-Βιότοπος

Ἡ **οικογένεια** Aristolochiaceae εἶναι μὴ μικρὴ οικογένεια με 8 γένη καὶ περίπου 624 εἶδη (<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Aristolochiaceae/>). Ἀρκετὰ ἀπὸ τα εἶδη τῆς οικογένειας εἶναι σημαντικά ὡς θεραπευτικὰ μέσα φυτικῆς προέλευσης ἐνῶ ἓνας ἀριθμὸς αὐτῶν καλλιεργεῖται γιὰ καλωπιστικούς λόγους. Ἡ οικογένεια ἀποτελεῖται ἀπὸ πολυετεῖς πόες, θάμνους ἢ ξυλώδη ἀναρριχώμενα φυτὰ, με ἀπλὰ, κατ' ἐναλλαγὴν φύλλα, ἀκέραια, ἔμμισχα ἢ ἐπιφυή, χωρὶς παράφυλλα καὶ ἔλασμα κάποιες φορές καρδιοειδῆ ἢ νεφροειδῆ. Οἱ ρίζες εἶναι

συνήθως κονδυλώδεις στις πόες. Τα άνθη είναι μονήρη ή σε μασχαλιαίες συστάδες, ερμαφρόδιτα, συνήθως τριμερή σε ένα σπόνδυλο που αντιστοιχεί στα σέπαλα ή σε 2 σπόνδυλους με τον εσωτερικό σπόνδυλο να αποτελείται από μειωμένα πέταλα. Το περιάνθιο αποτελείται από έναν ανθικό σωλήνα και 1 ή 3 επάκριους λοβούς. Οι στήμονες είναι 6 έως 12, ελεύθεροι σε μια ή δύο σειρές (τα νημάτια συμφύονται στην ωοθήκη (*Asarum*)) ή λίγο-πολύ ενωμένοι σχηματίζοντας στήλη με ελεύθερους ανθήρες (*Thottea*) ή με νημάτια και ανθήρες προς σχηματισμό του γυνοστέμιου (*gynostemium*) (*Aristolochia*). Η ωοθήκη είναι επιφυής έως υποφυής, σχηματίζει συγκάρπιο, με 6 χώρους-διαμερίσματα (4 στο γένος *Thottea*) και 6 στύλους ελεύθερους ή ενωμένους που στο τέλος σχηματίζουν ένα τρίλοβο ή εξάλοβο στίγμα. Ο καρπός είναι κάψα, χυμώδης ή ξερή, με πολυάριθμους σπόρους τοποθετημένους σε ένα σπογγώδες ενδοκάρπιο^{169 170}. Η οικογένεια εμφανίζει μεγάλη ποικιλομορφία των αναπαραγωγικών οργάνων των φυτικών ειδών της. Τα είδη του γένους *Asarum* (π.χ. *Asarum europaeum*) φέρουν 12 στήμονες, ελεύθερους, άνθη ακτινόμορφα, στο επίπεδο του εδάφους επάκρια πάνω σε πολύ βραχύ βλαστό, ενώ τα είδη του γένους *Aristolochia* φέρουν 6 ή λιγότερους στήμονες που συμφύονται με τον στύλο, άνθη ζυγόμορφα, στις μασχάλες των εναέριων βλαστών.



Εικόνα 84. Αναπαράσταση φυτικών ειδών της οικογένειας Aristolochiaceae

Η εξάπλωση της οικογένειας είναι κυρίως παντροπική (τροπικές και υποτροπικές περιοχές), με μόνο 20 εύκρατα ευρωπαϊκά είδη τα οποία περιορίζονται κυρίως στη Μεσόγειο. Περιλαμβάνονται τα εξής γένη: *Aristolochia* (485 είδη), *Asarum* (121 είδη), *Euglypha* (1 είδος, *Euglypha rojasiana* Chodat & Hassl.), *Heterotropa* (2 είδη, *Heterotropa albescens* (F. Maek. & Akas.) Akas., *Heterotropa magnifica* (Tsiang) F. Maek.), *Hexastylis* (1 είδος, *Hexastylis rhombiformis* Gaddy), *Pararistolochia* (10 είδη), *Saruma* (1 είδος, *Saruma henryi* Oliv.) και *Thottea*

(3 είδη, *Thottea dependens* (Planch.) Klotzsch, *Thottea hainanensis* (Merr. & Chun) Ding Hou, *Thottea siliquosa* (Lam.) Ding Hou). Η οικογένεια ανήκει στην ομοταξία Μαγνολιίδες (Magnoliids) και συγκεκριμένα στην τάξη πιπερώδη (piperales) μαζί με τις οικογένειες Hydnoraceae, Lactoridaceae, Piperaceae και Saururaceae, ενώ η ίδια χωρίζεται σε δύο μονοφυλετικές υποοικογένειες, την Asaroideae, η οποία περιλαμβάνει τα ποώδη γένη *Asarum* και *Saruma*, και την Aristolochioideae, η οποία περιλαμβάνει τα γένη *Thottea* (25 είδη) και *Aristolochia*, τα όρια του οποίου παραμένουν ασαφή¹⁷¹. Γενικά το γένος *Aristolochia* είναι το πολυπληθέστερο της οικογένειας με 485 είδη, τα οποία αναφέρονται στη συλλογή 'The Plant List (<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Aristolochiaceae/Aristolochia/>)', και με μόλις 3 να ευδοκούν στην βορειοδυτική Ευρώπη. Το επόμενο πιο σημαντικό γένος της παραπάνω οικογένειας είναι το *Asarum*, με εκπρόσωπο στην Ευρώπη το *A. europaeum*.

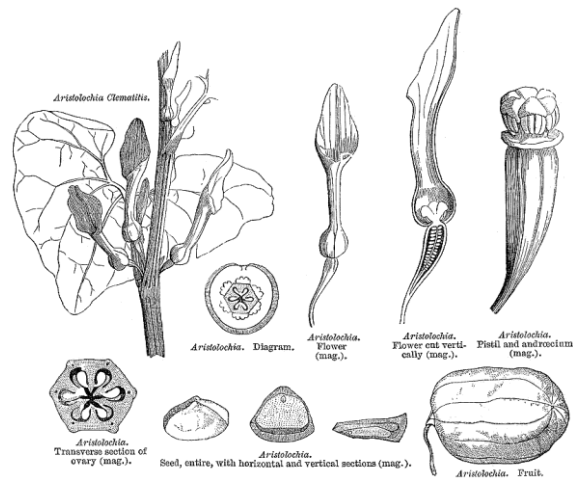
Το γένος *Aristolochia* αποτελείται από πόες με όρθιες εκφύσεις ή θάμνους με πολυετή ριζώματα και ετήσιους εναέριους βλαστούς ή αιθαλή ξυλώδη αναρριχώμενα είδη. Τα φύλλα είναι ακέραια (entire) ή τρίλοβα, συχνά καρδιόσχημα και κάποιες φορές με ένα μη ανεπτυγμένο μασχαλιαίο, ομοιάζον με παράφυλλο, φύλλο. Τα άνθη είναι ακανόνιστα, εκφύονται από τις μασχάλες των εναέριων βλαστών, με ποδίσκο, μονήρη ή σε δεσμίδες ή σε ταξιανθίες, τριχώδη εσωτερικά, με έγχρωμο (ιώδες), επίγυνο, ζυγόμορφο, σωληνοειδές περιάνθιο, συχνά αποτελούμενο από ένα διογκωμένο στη βάση «αχαίνιο», έναν ευθύ ή κυρτό «σωλήνα» και ένα ποικίλως προεκτεινόμενο έως αφανές επάκριο «χείλος». Οι στήμονες είναι συνήθως 6, ενωμένοι σε στήλη, σχηματίζοντας έναν παχύ και κοντό γυνοστέμιο με ένα εξάλοβο στίγμα και 6 κρεμάμενους προς τα έξω ανθήρες. Η ωσθήκη είναι υποφυής, συνήθως με 6 χώρους-διαμερίσματα, με σπερματοβλάστες πολυάριθμες σε κάθε χώρο. Ο καρπός είναι εξαβάλβιδη (valves) φραγμορραγή κάψα, διαρρηγνυόμενη από τη βάση προς την κορυφή και αποτελείται από 6 καρπόφυλλα. Τα σπέρματα είναι δελτοειδή, πολυάριθμα με μεγάλο σαρκώδες ενδοσπέρμιο και μικρό έμβρυο, συμπιεσμένα, συνήθως χτυπημένα (winged) γύρω ή παχειά με ένα ελαιόσωμα¹⁷².

Το γένος *Aristolochia* εμφανίζει μειωμένη ποικιλομορφία σε περιοχές του βορείου ημισφαιρίου με εύκρατο κλίμα. Για παράδειγμα στη Βόρεια Αμερική απαντώνται μόνο 5 είδη, ενώ στην Ασία υπάρχουν περίπου 45 είδη. Στο βόρειο ημισφαίριο, περιοχές με μεγάλο βαθμό ενδημισμού για το παραπάνω γένος, εμφανίζουν ταυτόχρονα και μεγάλο αριθμό ειδών. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση της ευρύτερης περιοχής της Μεσογείου, όπου η Δυτική

Μεσόγειος αριθμεί 16 είδη, ενώ η Ανατολική 26 είδη. Τα είδη της Δυτικής Μεσογείου χαρακτηρίζονται από άλοβα άνθη με ευθύ ή σε σχήμα U ανθικό σωλήνα και μικρό περιάνθιο, σε αντίθεση με τα είδη της Ανατολικής Μεσογείου τα οποία εμφανίζουν συνήθως δίλοβα άνθη με σιγμοειδή ή σε σχήμα U ανθικό σωλήνα και μεγαλύτερο περιάνθιο.

Τα είδη που συναντούμε στην Ελλάδα είναι τα εξής:

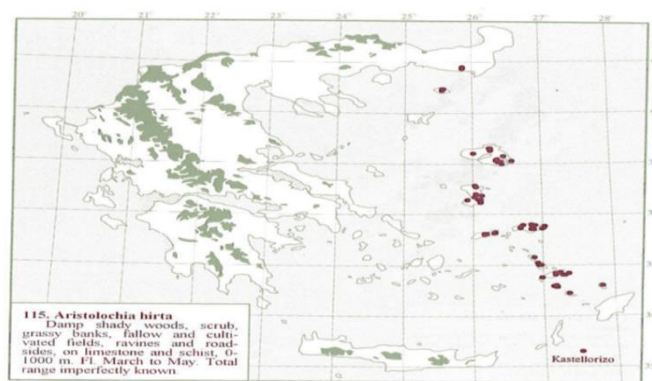
- *A. sempervirens*
- *A. hirta*
- *A. guihardii*
- *A. cretica*
- *A. incisa*
- *A. parvifolia*
- *A. pallida*
- *A. lutea*
- *A. elongata*
- *A. microstoma*
- *A. rotunda*
- *A. clematidis*



Εικόνα 85. Αναπαράσταση των φυτικών μερών του είδους *Aristolochia clematidis*

Το είδος *Aristolochia hirta* L. (1753) είναι ενδημικό της παραλιακής Μικράς Ασίας και των νήσων του ανατολικού Αιγαίου, όπως η Ικαρία, η Λέσβος, η Σάμος και η Χίος. Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων 'The Plant List' η *Aristolochia hirta* L. έχει ως συνώνυμα τα *Aristolochia pontica*

auct. fl. Grace., non Lam και *Aristolochia bodamae* Dingler¹⁷³. Συναντάται σε υψόμετρα από 0-1.000 m, σε πετρώδεις θαμνότοπους, ακαλλιέργητους αγρούς και στα όρια αυτών, καθώς επίσης σε θέσεις με ανθρωπογενή επιβάρυνση όπως άκρες δρόμων. Είναι πολυετής πόα με επιμήκες κυλινδρικό ρίζωμα, 10-50 mm, απλό ή διακλαδισμένο. Οι ετήσιοι βλαστοί είναι πάνω από 60 cm, με όρθια έκφυση απλοί ή διακλαδισμένοι. Τα φύλλα καλύπτονται τόσο στην πάνω πλευρά όσο και στη κάτω με μαλακό τρίχωμα και έχουν μίσχο μήκους 3-50 mm. Το σχήμα του ελάσματος είναι τριγωνικό προς ωοειδές, μεγέθους 25-160 x 24-130mm, με επίπεδα ή λυγισμένα κράσπεδα. Τα άνθη είναι μονήρη, ενώ ο ανθικός άξονας έχει μήκος 10-70 cm, μακρύτερος και σπανιότερα σχεδόν ίσος με τον μίσχο του φύλλου. Το περιάνθιο είναι μεγάλο, μήκους 60-140mm, με χρώμα κίτρινο-γκρι προς το κίτρινο-καφέ εξωτερικά, συχνά με καφέ-ιώδη χροιά. Ο ασκός του άνθους έχει μέγεθος 10-25 x 8-20 mm και έχει σχήμα κανάτας. Ο ανθικός σωλήνας είναι έντονα κυρτός σε σχήμα U, 4-10 mm πλάτος στη βάση. Το άκρο της ανθικής στεφάνης είναι κοίλο, κυκλικό προς ωοειδές, με μέγεθος 25-60 x 15-40 mm και εμφανώς ευρύτερο από τον ανθικό σωλήνα. Το χρώμα εσωτερικά είναι σκούρο καφέ προς καφέ-ιώδες, συχνά διάστικτο με κίτρινο-καφέ κηλίδες και λευκές τρίχες. Η ωοθήκη έχει μήκος 5-15 mm με πυκνό μαλακό χνούδι. Η κάψα έχει μέγεθος 40-45 x 20-30 mm, είναι ελλειψοειδής με χρώμα ανοιχτό καφέ και διαρρηγνύεται από τη βάση. Επίσης, τα συλλεχθέντα στην παρούσα διατριβή είδη, *A. elongata* και *A. microstoma*, φέρουν αντιστοίχως τα εξής χαρακτηριστικά: 1) σωλήνα περιανθίου ατρακτοειδή ευρύτερο στο μέσον και κύρια ρίζα επιμήκη και 2) χείλος περιανθίου που είτε απουσιάζει, είτε έχει μειωθεί σε μικρή αιχμή.



Εικόνα 86. Εξάπλωση του είδους *Aristolochia hirta* στον Ελλαδικό χώρο

Συστηματική κατάταξη σύμφωνα με το σύστημα που έχει υιοθετήσει το USDA (<https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=ARIST2>):

Βασίλειο (Kingdom)	Φυτά (<i>Plantae</i>)
Υποβασίλειο (Subkingdom)	Τραχεόφυτα (<i>Tracheobionta</i>)
Υπεράθροισμα (Superdivision)	Σπερματόφυτα (<i>Spermatophyta</i>)
Άθροισμα (Division)	Ανθοφόρα φυτά (<i>Magnoliophyta</i>)
Κλάση (Class)	Δικοτυλήδονα (<i>Magnoliopsida</i>)-
Υποκλάση (Subclass)	<i>Magnoliidae</i>
Τάξη (Order)	<i>Aristolochiales</i>
Οικογένεια (Family)	<i>Aristolochiaceae</i>
Γένος (Genus)	<i>Aristolochia</i> L.
Είδος (Species)	<i>Aristolochia hirta</i> L.



Εικόνα 87. *Aristolochia hirta* (φύλλα, ρίζα, άνθος)

10.2.3 Δρογοϊστορία-Δρογοετυμολογία

Η ετυμολογία του ονόματος του φυτού προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις “άριστος” και “λοχεία”, υποδεικνύοντας έτσι τη χρήση του φυτού για τη διευκόλυνση του τοκετού στην αρχαιότητα. Ο Θεόφραστος στο έργο του <<Περί φυτών ιστορία>> αναφέρει την αριστολόγια για την επούλωση των πληγών, ως υπνωτικό, αντίδοτο σε δηγήματα φιδιών και για την αντιμετώπιση προβλημάτων του τοκετού. Χαρακτηριστικά παρατίθεται το ακόλουθο απόσπασμα:

<<Την δε χρείαν αὐτῆς εἰς πολλὰ καταριθμοῦσιν ἀριστη μὲν πρὸς τὰ κεφαλόθλασα , ἀγαθὴ δὲ [και] πρὸς τὰ ἄλλα ἔλκη , και πρὸς ὕπνον , και πρὸς τὰ ἔρπετά , και πρὸς ὑστέραν , ὡς

πεσσός " τα μεν σύν ύδατα αναδευομένη και καταπλαττομένη, τα δ' άλλα εις μέλι ξυομένη και έλαιον' κατά δε τών ερπετών εν οίνω όξινη πινομένη, και επί τό δήγμα παττομένη. Εις ύπνον δε εν οίνω μέλανι αυστηρώ κνισθείσα. Εάν δε αι μήτραι προπέσωσι, τώ ύδατι αποκλύζειν.>>

Σύμφωνα με το έργο *De Divinatione* του Ρωμαίου Ρήτορα Κικέρωνα, το φυτό ονομάστηκε έτσι από τον Αριστόλοχο, ο οποίος έμαθε από ένα προφητικό όνειρο ότι το συγκεκριμένο βότανο αποτελεί αντίδοτο στο δηλητήριο των φιδιών και έτσι του έδωσε το όνομα του¹⁷⁴. Αναφορές στις θεραπευτικές χρήσεις του φυτού εντοπίζονται και σε γιατροσόφια κατά της Οθωμανικής περιόδου (1571-1878). Σύμφωνα με το *Ιατροσοφικόν*, ένα μοναστικό κείμενο της περιόδου αυτής το οποίο φυλάσσεται στη Μονή Μαχαίρα στην Κύπρο, η αριστολόχια χρησιμοποιούνταν για τη θεραπεία εμβοών, σε προβλήματα όρασης, δακρύρροια, για την αντιμετώπιση των πονοκεφάλων και της ημικρανίας. Ακόμη φαίνεται ότι τη χορηγούσαν σε περιπτώσεις απουσίας ή καθυστέρησης της εμμήνου ρύσεως. Άλλες χρήσεις που αναφέρονται στο κείμενο είναι η επούλωση πληγών, η βελτίωση της οσμής, η θεραπεία του κοινού κρυολογήματος και της αμυγδαλίτιδας.

Η χρήση ειδών του γένους *Aristolochia* είναι ευρεία στην Ασία και ιδιαίτερα στην κινεζική παραδοσιακή θεραπευτική. Πιο συγκεκριμένα, ο καρπός της αριστολόχιας, ο οποίος ονομάζεται Ma Dou Ling, θεωρείται ότι έχει ευεργετικές ιδιότητες σε παθήσεις του ήπατος και στην υπέρταση, ενώ χρησιμοποιείται μαζί με άλλες δρόγες σε περίπλοκα μείγματα έναντι παθήσεων του πνεύμονα. Επιπλέον, η ρίζα της αριστολόχιας αποτελεί συστατικό της φόρμουλας Zi Xue Dan, η οποία δίνεται για να "ψύξει" και να "καθαρίσει" το "ζεστό" αίμα, μια κατάσταση στην οποία εμφανίζονται συμπτώματα όπως: νυχτερινές εξάψεις, ντελίριο, ακαθόριστα δερματικά εξανθήματα, κόκκινη και ξηρή γλώσσα και γρήγορος και ασθενής παλμός. Άλλη μια φόρμουλα που έχει ως συστατικό τη ρίζα της αριστολόχιας είναι η Su He Xiang Wan¹⁷⁵.

10.2.4 Δρογοχημεία

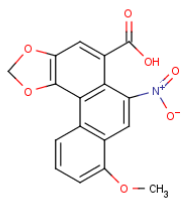
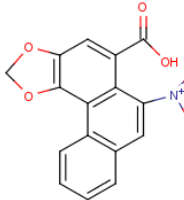
Η φυτοχημεία του γένους *Aristolochia* εμφανίζει ιδιαίτερη ποικιλομορφία, με τους δευτερογενείς μεταβολίτες να ανήκουν σε διάφορες χημικές κατηγορίες. Πιο συγκεκριμένα, οι δευτερογενείς μεταβολίτες του γένους κατηγοριοποιούνται σε 16 κύριες ομάδες με βάση τον σκελετό τους¹⁷⁶:

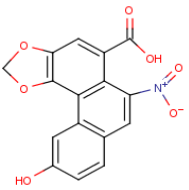
- Αριστολοχικά οξέα και εστέρες
- Αριστολακτάμες

- Απορφίνες
- Πρωτοβερβερίνες
- Ισοκινολίνες
- Βενζυλοϊσοκινολίνες
- Πρωτοπίνες
- Αμίδια
- Φλαβονοειδή
- Λιγνάνια
- Διφαινυλαιθέρες
- Κουμαρίνες
- Τετραλόνες
- Τερπενοειδή
- Παράγωγα βενζοϊκού οξέος
- Στεροειδή

Ενδεικτικά παρουσιάζονται παρακάτω ορισμένοι χαρακτηριστικοί αντιπρόσωποι ανά κατηγορία, οι χημικές δομές, οι πηγές προέλευσης και οι φαρμακολογικές δράσεις τους:

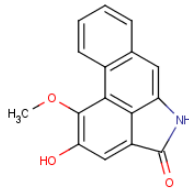
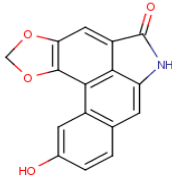
Πίνακας 9. Αριστολοχικά οξέα που έχουν απομονωθεί από το γένος *Aristolochia*

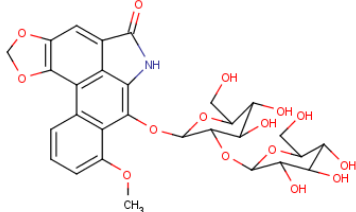
Αριστολοχικά οξέα		
Όνομα	Χημικός τύπος	Πηγή απομόνωσης
Αριστολοχικό οξύ I		<i>A.constricta</i> (βλαστός) <i>A.cretica</i> (ρίζα) <i>A.elegans</i> (βλαστός & ρίζα) <i>A.fangchi</i> (ρίζα) <i>A.manshuriensis</i> (βλαστός) <i>A.rubescens</i> (βλαστός & ρίζα)
Αριστολοχικό οξύ II		<i>A.fangchi</i> (ρίζα) <i>A.cretica</i> (ρίζα)

Αριστολοχικό οξύ IIIa		<i>A.cretica</i> (ρίζα) <i>A.fangchi</i> (ρίζα) <i>A.manshuriensis</i> (βλαστός)
-----------------------	---	--

Τα αριστολοχικά οξέα αποτελούν την περισσότερο φαρμακολογικά μελετημένη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών του γένους *Aristolochia*. Εμφανίζουν έντονη κυτταροτοξικότητα, κυρίως στα κύτταρα του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου¹⁷⁷. Η συγκεκριμένη δράση έχει αποδειχθεί ότι οφείλεται στο αριστολοχικό οξύ I και αριστολοχικό οξύ II, τα οποία μεταβολίζονται σε δραστικά ενδιάμεσα και ακολούθως συνδέονται ομοιοπολικά με το DNA¹⁷⁸. Παρά την τοξικότητα των παραγώγων αυτών, το αριστολοχικό οξύ IVa φαίνεται να έχει ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση¹⁷⁹. Επιπλέον μελέτες έχουν δείξει ότι το αριστολοχικό οξύ I έχει αντισπασμωδική¹⁸⁰ και αντιαιμοπεταλιακή δράση¹⁸¹. Άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι τα αριστολοχικά οξέα δρουν ως μη ανταγωνιστικοί αναστολείς της φωσφολιπάσης A2 δημιουργώντας ένα σύμπλεγμα με το ένζυμο σε αναλογία 1:1.

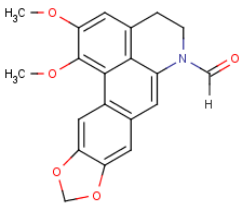
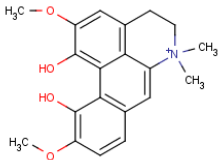
Πίνακας 10. Αριστολακτάμες που έχουν απομονωθεί από το γένος *Aristolochia*

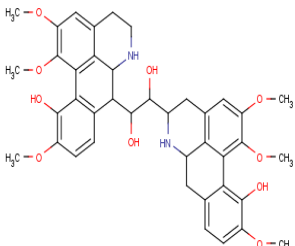
Αριστολακτάμες		
Όνομα	Χημικός τύπος	Πηγή απομόνωσης
Αριστολακτάμη AII		<i>A.constricta</i> (βλαστός) <i>A.elegans</i> (βλαστός & ρίζα)
Αριστολακτάμη IIIa		<i>A.gigantea</i> (ρίζα) <i>A.manshuriensis</i> (βλαστός)

<p>Αριστολακτάμη-9-O-β-D-γλυκοκυρανόσυλο-(1→2)-β-D-γλυκοκυρανόση</p>		<p><i>A.gigantea</i> (ρίζα)</p>
--	---	---------------------------------

Οι αριστολακτάμες, πέρα από δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτικών ειδών της οικογένειας Aristolochiaceae, αποτελούν και προϊόντα μεταβολισμού των αριστολοχικών οξέων σε ζωικά είδη, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Για παράδειγμα, ο κύριος μεταβολίτης του αριστολοχικού οξέος Ι είναι η αριστολακτάμη Ια. Οι αριστολακτάμες δεν είναι οι ίδιες μεταλλαξιογόνες ουσίες, αλλά απαιτείται η μεταβολική ενεργοποίηση από κάποιο άλλο μεταβολικό μονοπάτι, σε αντίθεση με τα αριστολοχικά οξέα. Όπως και τα αριστολοχικά οξέα, οι αριστολακτάμες διαθέτουν τοξικότητα αλλά εμφανίζουν και φαρμακολογικό ενδιαφέρον. Η αριστολακτάμη Ι είναι δραστική έναντι πολυανθεκτικών στελεχών του *Mycobacterium tuberculosis*, ενώ έχει βρεθεί ότι η αριστολακτάμη ΙΙα έχει ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση.

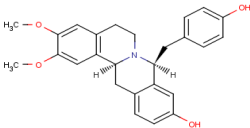
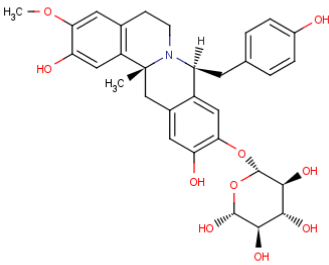
Πίνακας 11. Απορφίνες που έχουν απομονωθεί από το γένος *Aristolochia*

Απορφίνες		
Όνομα	Χημικός τύπος	Πηγή απομόνωσης
<p>N-φορμυλνορναντενίνη</p>		<p><i>A.brevipes</i> (ρίζα)</p>
<p>Μαγγοφλορίνη</p>		<p><i>A.elegans</i> (βλαστός & ρίζα) <i>A.gigantea</i> (ρίζα)</p>

<p>Λαγκεσιανίνη D</p>		<p><i>A. ligesiana</i> (φύλλα)</p>
-----------------------	---	------------------------------------

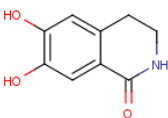
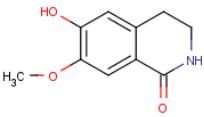
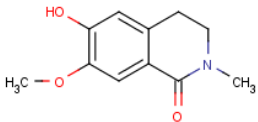
Οι απορφίνες αποτελούν μια από τις μεγαλύτερες ομάδες των αλκαλοειδών ισοκινολίνης. Η μαγνοφλορίνη είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα αλκαλοειδή ισοκινολίνης στα φυτά¹⁸². Ένδεικτικά αναφέρονται παρακάτω κάποιες φαρμακολογικές δράσεις της μαγνοφλορίνης. Η μαγνοφλορίνη που απομονώθηκε από το ρίζωμα του φυτού *Coptis chinensis* έδειξε ισχυρή αντι-φωτοοξειδωτική δράση¹⁸³. Επίσης, η μαγνοφλορίνη που απομονώθηκε από το μεθανολικό εκχύλισμα των βλαστών του φυτού *Tinospora cordifolia* επέδειξε υπογλυκαιμική δράση σε επίμυες, αναστέλλοντας την α-γλυκοσιδάση¹⁸⁴. Τέλος η μαγνοφλορίνη ενδεχομένως αποτελεί το υπεύθυνο δραστικό συστατικό για την αγχολυτική και κατασταλτική δράση που παρουσίασε το υδατοαλκοολικό εκχύλισμα του ριζώματος του φυτού *Sinomeni acutum* σε μύες¹⁸⁵.

Πίνακας 12. Πρωτοβερβερίνες που έχουν απομονωθεί από το γένος *Aristolochia*

Πρωτοβερβερίνες		
Όνομα	Χημικός τύπος	Πηγή απομόνωσης
<p>8β-(4'-υδροξυβενζυλο)-2,3-διμεθοξυβερβιν-10-ολη</p>		<p><i>A. constricta</i> (βλαστός)</p>
<p>8-βενζυλοβερβίνη Α</p>		<p><i>A. gigantea</i> (φύλλα)</p>

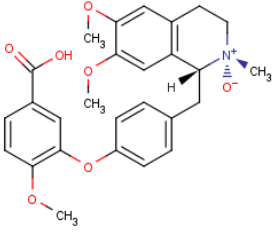
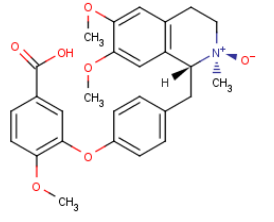
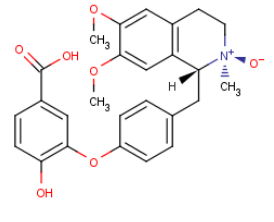
Δεν υπάρχουν μελέτες αξιολόγησης της φαρμακολογικής δράσης των πρωτοβερβερινών που έχουν απομονωθεί από το γένος *Aristolochia*. Πρωτοβερβερίνες έχουν ανιχνευθεί σε διάφορες οικογένειες του φυτικού βασιλείου: Anonaceae, Berberidaceae, Convolvulaceae, Lauraceae, Menispermatae, Papaveraceae, Ranunculaceae και Rutaceae. Ένας μεγάλος αριθμός υποκατεστημένων τετραϋδροπρωτοβερβερινών παρουσιάζει ηρεμιστικές ιδιότητες. Η βερβερίνη έχει αντιβακτηριδιακή και αντιπρωτοζωική δράση, η οποία οφείλεται στη δημιουργία συμπλόκων με το DNA. Μία άλλη πρωτοβερβερίνη, η ξυλοπινίνη, εμφανίζει ισχυρή αδρενεργική δράση α-ανταγωνιστή, μειώνοντας τη αρτηριακή πίεση σε πειραματόζωα, όπως κουνέλια¹⁸².

Πίνακας 13. Ισοκινολίνες που έχουν απομονωθεί από το γένος *Aristolochia*

Ισοκινολίνες		
Όνομα	Χημικός τύπος	Πηγή απομόνωσης
Περικαμπυλινόνη Α		<i>A. elegans</i> (βλαστός & ρίζα)
Κορυνταλτίνη		<i>A. elegans</i> (βλαστός & ρίζα)
Θαλιφολίνη		<i>A. elegans</i> (βλαστός & ρίζα)

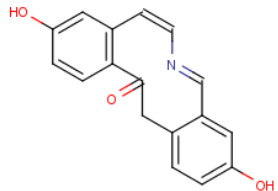
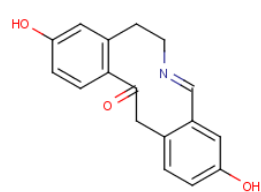
Η θαλιφολίνη, η οποία απομονώθηκε από το μεθανολικό εκχύλισμα του φλοιού του φυτού *Hernandia nymphaeifolia*, εμφάνισε κυτταροτοξική δράση στις κυτταρικές σειρές KB16, A549 και HT-29¹⁸⁶.

Πίνακας 14. Βενζυλοϊσοκινολίνες που έχουν απομονωθεί από το γένος *Aristolochia*

Βενζυλοϊσοκινολίνες		
Όνομα	Χημικός τύπος	Πηγή απομόνωσης
Αριστοκινολίνη Α		<i>A. elegans</i> (βλαστός & ρίζα)
Αριστοκινολίνη Β		<i>A. elegans</i> (βλαστός & ρίζα)
Αριστοκινολίνη C		<i>A. elegans</i> (βλαστός & ρίζα)

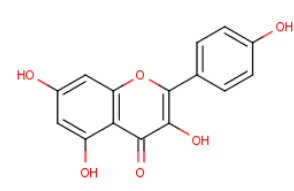
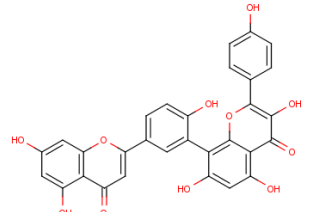
Μέχρι στιγμής, δεν έχει καταγραφεί κάποια αξιόλογη δράση για τα αλκαλοειδή βενζυλοϊσοκινολίνης που έχουν απομονωθεί από το γένος *Aristolochia*¹⁸⁷. Οι βενζυλοϊσοκινολίνες αποτελούν σημαντική χημική ομάδα αλκαλοειδών, καθώς αποτελούν πρόδρομα μόρια για την *in vivo* σύνθεση άλλων κατηγοριών αλκαλοειδών ισοκινολίνης, όπως οι ισοκινολόνες, οι παβίνες, οι διβενζυλοϊσοκινολίνες, οι απορφίνες, οι πρωτοβερβερίνες κ.ά. Ακόμη οι βενζυλοϊσοκινολίνες έχουν και οι ίδιες φαρμακολογικό ενδιαφέρον, με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα την παπαβερίνη, η οποία διαθέτει ισχυρή μυοαχαλαρωτική δράση και αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες¹⁸².

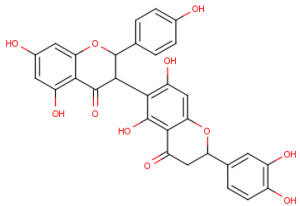
Πίνακας 15. Πρωτοπίνες που έχουν απομονωθεί από το γένος *Aristolochia*

Πρωτοπίνες		
Όνομα	Χημικός τύπος	Πηγή απομόνωσης
Κονστρικτοσίνη		<i>A. constricta</i> (βλαστός)
5,6- διύδροκονστρικτοΐνη		<i>A. constricta</i> (βλαστός)

Οι πρωτοπίνες που απομονώθηκαν από το είδος *A. constricta* επέδειξαν *in vitro* ευεργετική δράση στο σύνδρομο στέρησης που οφείλεται σε οποιοειδή.

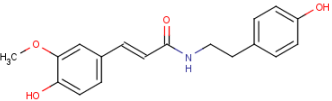
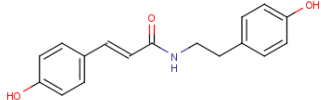
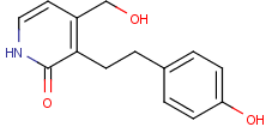
Πίνακας 16. Φλαβονοειδή που έχουν απομονωθεί από το γένος *Aristolochia*

Φλαβονοειδή		
Όνομα	Χημικός τύπος	Πηγή απομόνωσης
Καιμπφερόλη		<i>A. tagala</i> (ρίζα)
3''-υδροξυαμεντοφλαβόνη		<i>A. contorta</i> (καρπού)

Ριντικουλουφλαβόνη Α		<i>A.ridicula</i> (φύλλα)
----------------------	---	---------------------------

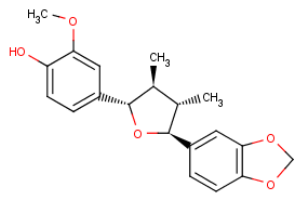
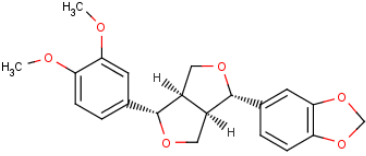
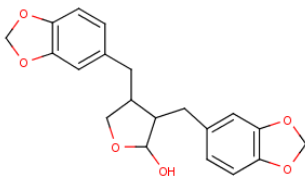
Εκχυλίσματα της ρίζας του είδους *A. tagala* παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη δράση, όπως έχει δειχθεί σε *in vitro* και *in vivo* πειράματα σε μύες και επίμυες, η οποία αποδόθηκε στο φλαβονοειδές καιμπφερόλη¹⁸⁸. Η καιμπφερόλη εμφανίζει αξιόλογες βιολογικές ιδιότητες, όπως αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακή σε πλήθος βακτηρίων (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*), αντιμυκητιασική έναντι του *Candida albicans*, αντιπρωτοζωική έναντι ειδών *Leishmania* spp. και αντική (έναντι του ιού της γρίπης, του συμπλέγματος του έρπη, του ιού ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV)). Άλλες δράσεις της είναι η αντιδιαβητική, η αντιαλλεργική και νευροπροστατευτική¹⁸⁹.

Πίνακας 17. Αμίδια που έχουν απομονωθεί από το γένος *Aristolochia*

Αμίδια		
Όνομα	Χημικός τύπος	Πηγή απομόνωσης
N-τρανσφερουλοΐτυραμίνη		<i>A.constricta</i> (βλαστός)
N-π-τρανσκουμαροΐτυραμίνη		<i>A.elegans</i> (βλαστός & ρίζα) <i>A.gigantea</i> (βλαστός)
Αριστοपुरιδόνη Α		<i>A.manshuriensis</i> (βλαστός)

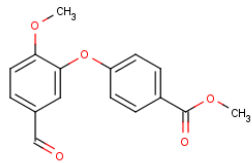
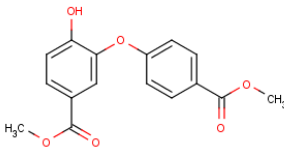
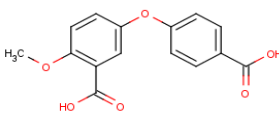
Το αμίδιο αριστολαμίδη II, το οποίο απομονώθηκε από μεθανολικό εκχύλισμα βλαστών του είδους *A. manshuriensis*, επέδειξε *in vitro* ανασταλτική δράση στην έκκριση ελασάσης από τα ουδετερόφιλα¹⁷⁹.

Πίνακας 18. Λιγνάνια που έχουν απομονωθεί από το γένος *Aristolochia*

Λιγνάνια		
Όνομα	Χημικός τύπος	Πηγή απομόνωσης
Ταλαουμίδη		<i>A. arcuata</i> (ρίζα)
Κομπουσίνη		<i>A. elegans</i> (βλαστός & ρίζα) <i>A. gigantea</i> (ρίζα & βλαστός)
Κουβεβίνη		<i>A. constricta</i> (βλαστός) <i>A. elegans</i> (βλαστός & ρίζα) <i>A. pubescens</i> (ρίζα & βλαστός) <i>A. lagesiana</i> (ρίζα) <i>A. malmeana</i> (ρίζα & φύλλα)

Τα νεολιγνάνια που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα των ριζών της *A. arcuata*, όπως η ταλαουμίδη, η γκαλγκραβίνη και η αριστολιγνίνη, παρουσιάζουν νευροπροστατευτική δράση¹⁹⁰. Λιγνάνια τύπου διβενζυλοβουτυρολακτόνης, τα οποία απομονώθηκαν από το φυτό *A. constricta*, όπως η κουβεβίνη, η χινοκινίνη και η πλουβιατολίδη, έχουν αντισπασμωδική δράση¹⁸⁰. Επιπλέον, εκχύλισμα των φύλλων του είδους *A. cymbifera* έχει επιδείξει αντιρυπανοσωμιακή δράση. Τα λιγνάνια που απομονώθηκαν από το ίδιο εκχύλισμα ανήκουν στα λιγνάνια τύπου φουροφουράνης, όπως η φαργκεσίνη, η επιευδεσμίνη και η σεσαμίνη. Λιγνάνια τύπου διβενζυλοβουτυρολακτόνης, όπως η χινοκινίνη και η κουσονοκίνη, η οποία είναι και η πιο δραστική, έχουν επίσης απομονωθεί¹⁹¹. Τέλος τα λιγνάνια κουονοκίνη, ευδεσμίνη και σεσαμίνη εμφανίζουν εντομοκτόνο δράση^{192 193}.

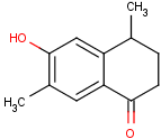
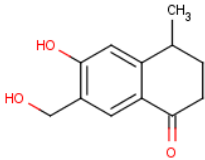
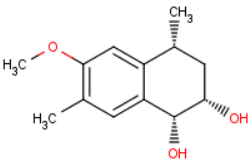
Πίνακας 19. Διφαινουλαιθέρες που έχουν απομονωθεί από το γένος *Aristolochia*

Διφαινουλαιθέρες		
Όνομα	Χημικός τύπος	Πηγή απομόνωσης
Αριστογίνη Α		<i>A. elegans</i> (βλαστός & ρίζα)
Αριστογίνη D		<i>A. elegans</i> (βλαστός & ρίζα)
4-μεθοξυ-3,4'- οξυβενζοϊκό οξύ		<i>A. elegans</i> (βλαστός & ρίζα)

Διφαινουλαιθέρες που απομονώθηκαν από το γένος *Aristolochia*, προέρχονται από το είδος *A. elegans* και θεωρείται ότι αποτελούν τελικό στάδιο του καταβολισμού των διβενζυλοϊσοκινολικών αλκαλοειδών¹⁷⁶. Στη βιβλιογραφία δεν έχουν αναφερθεί βιολογικές δράσεις για τους διφαινουλαιθέρες του γένους *Aristolochia*. Γενικά φαρμακολογικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι βρωμιωμένοι διφαινουλαιθέρες, οι οποίοι έχουν απομονωθεί από θαλάσσιους οργανισμούς. Παραδείγματα αποτελούν οι διφαινουλαιθέρες που απομονώθηκαν από το εκχύλισμα του οξικού μεθυλεστέρα του θαλάσσιου σπόγγου *Dysidea herbacea*, οι οποίοι εμφάνισαν αξιόλογη δράση έναντι του Gram (+) βακτηρίου *Bacillus subtilis* και του φυτοπαθογόνου μύκητα *Cladosporium cucumerinum*¹⁹⁴. Επίσης, βρωμιωμένος διφαινουλαιθέρας που απομονώθηκε από το αιθανολικό εκχύλισμα του πράσινου φύκου *Cladophora fascicularis* επέδειξε αντιβακτηριδιακή δράση έναντι των μικροοργανισμών *Bacillus subtilis*, *Eshcherichia coli* και *Staphylococcus aureus*, όπως και αξιόλογη αντιφλεγμονώδη δράση¹⁹⁵.

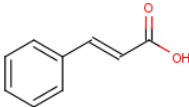
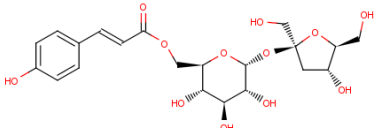
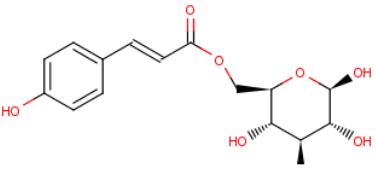
Πίνακας 20. Τετραλόνες που έχουν απομονωθεί από το γένος *Aristolochia*

Τετραλόνες		
Όνομα	Χημικός τύπος	Πηγή απομόνωσης

Αριστελεγόνη Α		<i>A.constricta</i> (βλαστός) <i>A.elegans</i> (βλαστός & ρίζα)
Αριστελεγόνη C		<i>A.elegans</i> (βλαστός & ρίζα)
Αριστελεγόνη D		<i>A.elegans</i> (βλαστός & ρίζα)

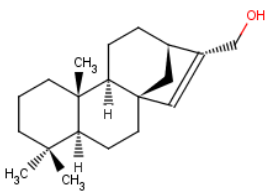
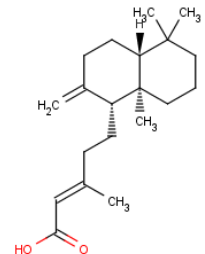
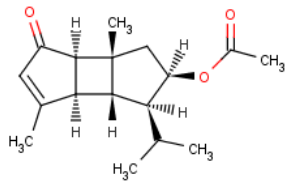
Οι τετραλόνες που απομονώθηκαν από το γένος *Aristolochia* δεν έχουν εμφανίσει μέχρι σήμερα κάποια αξιοσημείωτη δράση¹⁹⁶. Ωστόσο υπάρχουν αναφορές τετραλονών φυσιικής προέλευσης, οι οποίες έχουν αξιόλογες φαρμακολογικές δράσεις. Παράδειγμα αποτελεί η 4-υδροξυ-1-τετραλόνη η οποία απομονώθηκε από το χλωροφορμικό εκχύλισμα του φλοιού του φυτού *Ampelocera edentula* (Ulmaceae) και εμφάνισε σημαντική *in vitro* και *in vivo* δράση έναντι προμαστιγωτών μορφών στελεχών του γένους *Leishmania*¹⁹⁷.

Πίνακας 21. Παράγωγα βενζοϊκού οξέος που έχουν απομονωθεί από το γένος *Aristolochia*

Παράγωγα βενζοϊκού οξέος		
Όνομα	Χημικός τύπος	Πηγή απομόνωσης
Κινναμωμικό οξύ		<i>A.elegans</i> (βλαστός & ρίζα)
Ακρετοσίδης		<i>A.cretica</i> (ρίζα)
6-O-π-κουμαρούλο-β-D-γλυκοκυρανόση		<i>A.cretica</i> (ρίζα)

Η φικουσόλη είναι ένα από τα φαινολικά παράγωγα που έχουν απομονωθεί από την *A. elegans*. Μελέτες έδειξαν ότι η φικουσόλη που απομονώθηκε από εκχύλισμα οξικού μεθυλεστέρα των βλαστών του φυτού *Manihot esculenta*, επέδειξε ισχυρή αντιοξειδωτική δράση στις δοκιμασίες DPPH και ABTS¹⁹⁸. Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι το κινναμωμικό οξύ έχει ανασταλτική δράση επί της τυροσινάσης του μύκητα *Agaricus bisporus*, δρώντας ως μη συναγωνιστικός ανταστολέας¹⁹⁹. Επιπλέον το κινναμωμικό οξύ και τα παράγωγα του εμφανίζουν ανασταλτική δράση έναντι της α-γλυκοσιδάσης²⁰⁰ και αντιοξειδωτική και αντικαρκινική δράση σε διάφορες κυτταρικές σειρές, όπως αυτές του μελανώματος HT-144 και του παχέος εντέρου HT-29²⁰¹.

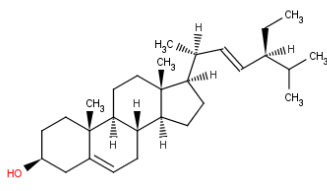
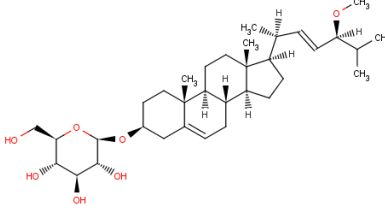
Πίνακας 22. Τερπένια που έχουν απομονωθεί από το γένος *Aristolochia*

Τερπένια		
Όνομα	Χημικός τύπος	Πηγή απομόνωσης
Καουρ-15-εν-17-όλη		<i>A. constricta</i> (βλαστός) <i>A. elegans</i> (βλαστός & ρίζα) <i>A. rufescens</i> (βλαστός & ρίζα)
Κοπαλικό οξύ		<i>A. cymbifera</i> (φύλλα) <i>A. malmeana</i> (φυλλα)
Αριστολολίδη		<i>A. elegans</i> (βλαστός & ρίζα)

Στο γένος *Aristolochia* έχουν ανιχνευθεί μονοτερπένια, σεσκιτερπένια, διτερπένια, τριτερπένια και τετρατερπένια. Τα μονοτερπένια ανιχνεύονται κυρίως στο αιθέριο έλαιο, το οποίο περιέχει κυρίως άκυκλα μονοτερπένια, πινένια και καμφένια²⁰². Μελέτες δείχνουν ότι το αιθέριο έλαιο φυτών του γένους έχει αντιμικροβιακή δράση. Τα κύρια σεσκιτερπένια που έχουν

απομονωθεί από το γένος *Aristolochia* ανήκουν στην κατηγορία των καντινανών, αριστολανών, γερμακρανίων και δικυκλογερμακρανίων. Κλάσμα μη πολικού εκχυλίσματος των ριζών του φυτού *A. chilensis*, το οποίο περιείχε σεσκιτερπένια, έδειξε αλλοπαθητική δράση. Τα σεσκιτερπένια αριστολακτόνη και μανσουρολίδη φαίνεται να έχουν αντιαιμοπεταλιακή δράση. Επίσης, η βερσιλολακτόνη από το είδος *A. versicolor* εμφάνισε αντικαρκινική δράση σε ηπατικές καρκινικές σειρές. Η μανσονόνη G που παραλήφθηκε από το *A. liukiensis* παρουσίασε αντιρετροϊκή δράση έναντι του HIV²⁰². Τα διτερπένια αποτελούν μια μεγάλη ομάδα μεταβολιτών που έχουν απομονωθεί από το γένος *Aristolochia*. Το διτερπένιο κολουμπίνη, το οποίο απομονώθηκε από τις ρίζες της *A. albidia*, επέδειξε σε *in vivo* πειράματα ότι μειώνει σημαντικά τα τοξικά συμπτώματα και προστατεύει τα ποντίκια από θανατηφόρες δόσεις δηλητηρίου φιδιών του είδους *Naja nigricollis* και *Bitis arietans*.

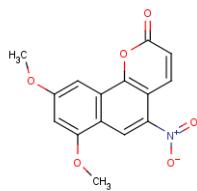
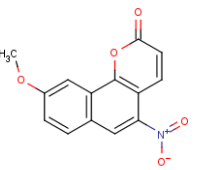
Πίνακας 23. Στεροειδή που έχουν απομονωθεί από το γένος *Aristolochia*

Στεροειδή		
Όνομα	Χημικός τύπος	Πηγή απομόνωσης
β-σιτοστερόλη		<i>A. brevipes</i> (ρίζα) <i>A. elegans</i> (βλαστός & ρίζα) <i>A. gigantea</i> (ρίζα)
Γλυκοσίδη της β-σιτοστερόλης		<i>A. constricta</i> (βλαστός) <i>A. elegans</i> (βλαστός & ρίζα)

Η β-σιτοστερόλη αποτελεί μία από τις τρεις κύριες, μαζί με την καμπεστερόλη και τη σιγμαστερόλη, φυτοστερόλες που λαμβάνονται μέσα από τη διατροφή. Μελέτες στη β-σιτοστερόλη έχουν δείξει πληθώρα δράσεων, όπως αντιφλεγμονώδη δράση τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* μοντέλα, κυτταροτοξική δράση σε διάφορες καρκινικές σειρές (π.χ. στην ανθρωπινή λευχαιμική σειρά U937 και στη σειρά MDA-MB-231 από ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού),

αλλά και αντιοξειδωτική δράση. Αρκετές κλινικές μελέτες σχετικές με τη δραστικότητα της β-σιτοστερόλης στην υπερπλασία του προστάτη, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι βελτιώνει τη μηχανική της ούρησης και τα υπόλοιπα συμπτώματα από το ουροποιητικό. Σε άλλη κλινική μελέτη, φάνηκε ότι διαιτητικά προϊόντα πλούσια σε β-σιτοστερόλη έχουν την ικανότητα να μειώνουν τα επίπεδα της LDL χοληστερίνης και των τριγλυκεριδίων²⁰³.

Πίνακας 24. Κουμαρίνες που έχουν απομονωθεί από το γένος *Aristolochia*

Κουμαρίνες		
Όνομα	Χημικός τύπος	Πηγή απομόνωσης
7,9-διμεθοξυταριακουριπυρόνη		<i>A. brevipes</i> (ρίζα)
9-μεθοξυταριακουριπυρόνη		<i>A. brevipes</i> (ρίζα)

Η 7,9-διμεθοξυταριακουριπυρόνη και η 9-μεθοξυταριακουριπυρόνη έχουν αντιβακτηριακή δράση έναντι του φαρμακοανθεκτικού *Mycobacterium tuberculosis*. Επίσης, αναφέρεται ότι η 9-μεθοξυταριακουριπυρόνη έχει ισχυρή μεταλλαξιογόνο δράση²⁰⁴.

10.2.5 Δρογοφαρμακολογία

Παραδοσιακές Χρήσεις - Εθνοφαρμακολογικές Μελέτες – Τοξικότητα

Σύμφωνα με τους Heinrich *et al.* υπάρχουν 1445 εθνοφαρμακολογικές αναφορές της αριστολόχιας στη διεθνή βιβλιογραφία, ενώ σχεδόν οι μισές προέρχονται από την Ασία (κυρίως την Κίνα και την Ινδία) σε ποσοστό 49.5%, ενώ το 32.3% των αναφορών προέρχεται από την Αμερική. Επισημαίνεται πως σε 147 από αυτές τις αναφορές καταγράφονται φυτά του γένους *Aristolochia* ως αντίδοτα σε δήγματα φιδιών. Η πιο συχνά αναφερόμενη χρήση είναι η θεραπεία γαστρεντερικών παθήσεων, και η αμέσως επόμενη είναι η χρήση της ως αντιδότη. Άλλες θεραπευτικές χρήσεις που έχουν καταγραφεί σχετίζονται με γυναικολογικές παθήσεις, παθήσεις του κεντρικού νευρικού συστήματος, δερματικές παθήσεις και μεταδιδόμενες ασθένειες, ενώ

έχει καταγραφεί και η παρασιτοκτόνος δράση. Λιγότερο συχνές είναι οι αναφορές που αφορούν το μυοσκελετικό, το αναπνευστικό και το νεφρικό σύστημα²⁰⁵.

Οι εθνοφαρμακολογικές αναφορές που υπάρχουν συγκεκριμένα για την *Aristolochia hirta* προέρχονται από την Τουρκία. Στη πόλη Canakkale φυτοθεραπευτές χρησιμοποιούν τη ρίζα και τα φύλλα αναμειγμένα με μέλι για παθήσεις του γαστρεντερικού²⁰⁶. Επίσης, στο χωριό Maldan χρησιμοποιούν τη ρίζα χτυπημένη μαζί με μέλι ως αποχρεμπτικό και σε καρκίνο του πνεύμονα²⁰⁷. Στη περιοχή της Μικράς Ασίας προτείνεται η *Aristolochia hirta* ως επουλωτικό για τα στοματικά έλκη²⁰⁸, ενώ το έγχυμα ενδείκνυται για στομαχικούς πόνους και ως αντίδοτο σε δηγήματα φιδιού και σκορπιού²⁰⁹. Τέλος, υπάρχει ακόμα μια αναφορά για τη χρήση της *Aristolochia hirta* ως ανακουφιστικό σε στομαχικούς πόνους²¹⁰.

Παρά τη μακροχρόνια παραδοσιακή χρήση ειδών του γένους *Aristolochia*, σύγχρονα δεδομένα κατατάσσουν το φυτό ως ένα από τα πιο τοξικά. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η νεφροπάθεια οφειλόμενη σε κινεζικά βότανα (Chinese Herb Nephropathy CHN) η οποία πρωτοαναφέρθηκε το 1993. Μια κλινική αδυνατίσματος στις Βρυξέλλες χρησιμοποιούσε χάπια αδυνατίσματος από κινεζικά βότανα, ένα εκ των οποίων ήταν η *Stephanaria tetrandra*. Η *Stephanaria tetrandra* αντικαταστάθηκε εσφαλμένα από την *Aristolochia fangchi*, διότι και οι δύο δρόγες έχουν στην παραδοσιακή κινεζική θεραπευτική την κοινή ονομασία Fangji. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα πάνω από 100 άτομα στα οποία χορηγήθηκε η παραπάνω δρόγη να εμφανίσουν νεφρική ανεπάρκεια οφειλόμενη στα αριστολοχικά οξέα. Μετέπειτα μελέτες συνδέουν την αριστολόγια με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ουροθηλιακού καρκίνου²⁰⁵.

Παρόμοια περίπτωση αποτελεί η ενδημική βαλκανική νεφροπάθεια. Η ενδημική βαλκανική νεφροπάθεια είναι μια καταστροφική νεφρική ασθένεια που εμφανίζεται τόσο σε άνδρες όσο και σε γυναίκες, οι οποίοι ζουν σε αγροτικά χωριά στη Βοσνία, Βουλγαρία, Κροατία, Ρουμανία και Σερβία κατά μήκος του Δούναβη. Η ασθένεια αυτή χαρακτηρίζεται από ξαφνική εκδήλωση, έχει σταθερή και αμετάβλητη εξέλιξη σε νεφρική ανεπάρκεια και αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ουροθηλιακού καρκινώματος του ανώτερου ουροποιητικού συστήματος. Η εκπληκτική ακρίβεια της γεωγραφικής εξάπλωσης της νόσου παρέμεινε σταθερή από τότε που πρωτοαναφέρθηκε στα τέλη της δεκαετίας του '50 και αυτό προσέδωσε το ενδιαφέρον για την διεξαγωγή πολλών επιδημιολογικών μελετών. Αυτές οι μελέτες προσέδωσαν κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της νόσου, όπως ότι η ασθένεια εμφανίζεται σε μέλη της ίδιας οικογένειας χωρίς

όμως να έχει κληρονομικό χαρακτήρα, η εμφάνιση της προϋποθέτει την εγκαθίδρυση του ατόμου στο συγκεκριμένο τόπο για τουλάχιστον 15 χρόνια και δεν εμφανίζεται ποτέ σε παιδιά. Οι υποψίες αρχικά επικεντρώθηκαν σε περιβαλλοντικές τοξίνες, όπως μυκοτοξίνες, φυτοτοξίνες, βαρέα μέταλλα και ιούς. Τελικά μετά από το περιστατικό της κλινικής του Βελγίου και λόγω των έντονων κλινικών και ιστοπαθολογικών ομοιοτήτων οι υποψίες στραφήκαν στα αριστολοχικά οξέα. Έτσι, η εξήγηση που δόθηκε για την εμφάνιση της ενδημικής βαλκανικής νεφροπάθειας ήταν ότι σε αυτές τις περιοχές το ψωμί φτιάχνεται παραδοσιακά από αλεύρι από τοπικά καλλιεργούμενα σιτηρά. Στα καλλιεργούμενα αυτά χωράφια φυτρώνει η *Aristolochia clematitis*, της οποίας σπόροι ανακατεύονται με σπόρους σιταριού κατά την ετήσια συγκομιδή. Έτσι, πιστεύεται ότι η κατανάλωση αλευριού επιμολυσμένου με σπόρους αριστολόχιας δημιουργεί με την πάροδο του χρόνου παρόμοια έκθεση σε αριστολοχικά οξέα όπως στα περιστατικά της κλινικής του Βελγίου με τις αντίστοιχες επιπτώσεις. Το 2002 ο διεθνής οργανισμός ερευνών για τον καρκίνο (IARC) χαρακτήρισε τις φυτοθεραπευτικές συνταγές που περιέχουν φυτά του γένους *Aristolochia* και τα φυσικής προέλευσης μείγματα που περιέχουν αριστολοχικά οξέα ως καρκινογόνα για τον άνθρωπο²⁰⁵.

Σύγχρονες φαρμακολογικές μελέτες

Ποικίλες μελέτες βιολογικής αξιολόγησης έχουν πραγματοποιηθεί προκειμένου να εξεταστούν οι παραδοσιακές χρήσεις ειδών του γένους *Aristolochia*. Ορισμένα από τα είδη όπως *A. baetica*, *A. bracteolata*, *A. indica*, *A. malmeana* και *A. pubescens* έχουν καταγραφεί ως δρόγες με εντομοκτόνες και εντομοαπωθητικές δράσεις. Τα ολικά εκχυλίσματα των *A. brevipes*, *A. cymbifrea*, *A. indica*, *A. mollissima* και *A. taliscana* έχουν επιδείξει αξιοσημείωτη αντιμικροβιακή δράση. Το φυτοχημικό φορτίο και η φαρμακολογία του γένους *Aristolochia* έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας λόγω των πολλαπλών παραδοσιακών τους χρήσεων και των ποικίλων βιολογικών μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί στα αρχικά εκχυλίσματα. Συνεπώς η αριστολόχια αποτελεί ένα από τα περισσότερο μελετημένα γένη και πλέον πολλές είναι οι δημοσιευμένες αναφορές γύρω από τους σημαντικούς μεταβολίτες του γένους.

Σε μελέτες έχει δειχθεί ότι το αριστολοχικό οξύ I εμφανίζει αξιοσημείωτη κυτταροτοξικότητα, αν και ο ίδιος μεταβολίτης καθώς επίσης και το αριστολοχικό οξύ IVa, η αριστολακτάμη IIIa και το αριστολαμίδιο II εμφάνισαν σημαντικές αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Τα λιγνάνια, ταλαουμιδίνη, γκαλγκραβίνη αριστολιγνίνη, νεκτανδρίνη A, ισονεκτανδρίνη B και

νεκτανδρίνη Β, τα οποία παραλήφθηκαν από το είδος *A. arcuata* επέδειξαν νευροπροστατευτική δράση. Επιπροσθέτως οι (-)-χινοκινίνη, (-)-κουβεβίνη, (-)-πλουβιατολίδη και (-)-χαπλομυρφολόλη από την *A. constricta* εμφάνισαν αντισπασμωδική δράση. Ένα διτερπένιο, το (-)-καουρ-16-εν-19-οϊκό οξύ είχε αντισπασμωδική δράση. Η *A. constricta* αποτελεί ένα θεραπευτικό φυτό το οποίο συναντάται στο Εκουαδόρ και εξαπλώνεται ευρέως στη Νότια Αμερική. Οι πρωτοβερβερίνες που έχουν παραληφθεί από το συγκεκριμένο είδος έχουν επιδείξει αντι-εξαρτησιογόνες δράσεις και αυτά τα αποτελέσματα ανέδειξαν την ικανότητα των αλκαλοειδών να ασκούν σημαντική επίδραση στη διακοπή των οπιοειδών (σύνδρομο στέρησης) *in vitro*, ενώ οι ουσίες αυτές μπορούσαν να δρουν τόσο στους μύες όσο και στους κεντρικούς οπιοειδών. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες λισαρίνη Α, λισαρίνη Β και ευποματενοΐδη-7 που εντοπίστηκαν στο είδος *A. taliscana* και οι 7,9-διμεθοξυταριακουριπυρόνη, 9-μεθοξυταριακουριπυρόνη και αριστολακτάμη Ι από το είδος *A. brevipes*, αξιολογήθηκαν για τις αντιμικροβιακές τους δράσεις και τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν τις ισχυρές δράσεις των αρχικών εκχυλισμάτων. Οι μελέτες αυτές απέδειξαν ότι το διχλωρομεθανικό εκχύλισμα των ριζωμάτων του είδους *A. brevipes* και τα εξανικά εκχυλίσματα του *A. taliscana* παρουσιάζουν ισχυρή *in vitro* αντιμικροβιακή δράση έναντι του *Mycobacterium tuberculosis*. Μεταξύ των ουσιών που εξετάστηκαν, η λισαρίνη Α αποτέλεσε το πιο δραστικό συστατικό με ελάχιστες συγκεντρώσεις αναστολής (MICs) από 3.12-12.5 μg/mL έναντι συγκεκριμένων στελεχών του είδους. Το είδος *A. cymbifera* έχει χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά ως εκτριπτικό και εμμηναγωγό, καθώς επίσης και για την αντιμετώπιση του πυρετού, της διάρροιας και του εκζέματος. Οι μεταβολίτες (-)-κουσουνοκινίνη και (-)-κοπαλικό οξύ, που παραλήφθηκαν από τη δρόγη, ήταν οι πιο δραστικοί έναντι του είδους *Trypanosoma cruzi* που ευθύνεται για την ασθένεια Chagas, μια από τις κύριες αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας σε πολλές περιοχές της Νότιας Αμερικής. Επιπλέον, το (-)-κοπαλικό οξύ εμφάνισε την σημαντικότερη εκλεκτική δράση, με αποτέλεσμα να επιδεικνύει χαμηλή τοξικότητα στα υγιή κύτταρα, παρά την αξιοσημείωτη αιμολυτική δράση στις υψηλότερες συγκεντρώσεις. Ανάμεσα στα απομονωθέντα μόρια, η (-)-κουσουνοκινίνη μπορεί να θεωρηθεί ως η περισσότερα υποσχόμενη ουσία, καθώς εμφάνισε σημαντική δράση ενάντια των ενδοκυτταρικών αμαστιγωτών και τρυπομαστιγωτών χωρίς την αιμολυτική δράση¹⁷⁶.

10.3 Πειραματικό Μέρος

10.3.1 Εκχυλίσεις και Έλεγχος χημικού φορτίου ολικών εκχυλισμάτων

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας συλλέχθηκαν τρία είδη του γένους *Aristolochia* προκειμένου να πραγματοποιηθεί σύγκριση του χημικού προφίλ και της βιολογικής δράσης τους και να επιλεγεί ένα είδος για περαιτέρω φυτοχημική μελέτη. Πιο συγκεκριμένα, οι ρίζες του είδους *Aristolochia elongata* συλλέχθηκαν στις 10.05.2015, από το όρος Δύρφιν, σε υψόμετρο 980m (38 μοίρες 36' 13.36" Β 23 μοίρες 52' 20.02" Ε). Οι ρίζες της *A. microstoma* συλλέχθηκαν στις 13.05.2015, από την Πανεπιστημιούπολη Ζωγράφου και συγκεκριμένα από το ρέμμα κάτω από το κτίριο της ενέργειας. Το είδος *Aristolochia hirta* και συγκεκριμένα τα υπέργεια τμήματα (φύλλα, βλαστοί), οι ρίζες, τα άνθη και οι καρποί συλλέχθηκαν τον Απρίλιο του 2016 από την Ικαρία, σε περιοχή πλησίον του στο χωριού Πετροπούλι. Μετά από όλες τις συλλογές ακολούθησε ο τεμαχισμός των ριζών, η κατάψυξη όλων των τμημάτων στους -80 °C, η λυοφιλοποίησή τους για την απομάκρυνση της υγρασίας και η κονιοποίηση των ξηρών φυτικών υλικών. Τα κονιοποιημένα ξηρά φυτικά υλικά εκχυλίστηκαν με τη χρήση υπερήχων χρησιμοποιώντας διαδοχικά διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας ως εξής: διχλωρομεθάνιο (DCM), αιθανόλη (EtOH) ή μεθανόλη (MeOH) για την *A. hirta* και αιθανόλη:νερό 50:50 (EtOH:H₂O 50:50) ή μεθανόλη:νερό (MeOH: H₂O 50:50) για την *A. hirta*. Τα άνθη της *A. hirta* εκχυλίστηκαν διαδοχικά με οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc) και μεθανόλη (MeOH). Για καθένα από τα προαναφερόμενα διαλυτικά μέσα πραγματοποιήθηκαν 2 κύκλοι της διαδικασίας, διάρκειας 30 λεπτών ο καθένας, αποφεύγοντας τη θέρμανση του υλικού (σταθερή θερμοκρασία 20-25 °C). Στην περίπτωση παρασκευής υδατοαλκοολικών εκχυλισμάτων παρατάθηκε η διαβροχή του υλικού (δεύτερος κύκλος) για 12h προκειμένου να γίνει δυνατή η εξαντλητική παραλαβή των συστατικών. Οι διαλύτες εκχύλισης απομακρύνονταν κάθε φορά με τη χρήση Rotavapor ή λυοφιλοποίησης όπου υπήρχε νερό, ενώ τα ξηρά εκχυλίσματα αποθηκεύτηκαν σε σκουρόχρωμα φιαλίδια. Στην *A. elongata* το βάρος της σκόνης των ριζών που εκχυλίστηκαν ήταν 50 g, στην *A. microstoma* 26 g και στην *A. hirta* 50 g, ενώ οι σκόνες των υπέργειων τμημάτων και των ανθέων της *A. hirta* ήταν 50 g και 6.25 g, αντίστοιχα. Οι αποδόσεις των εκχυλίσεων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 25).

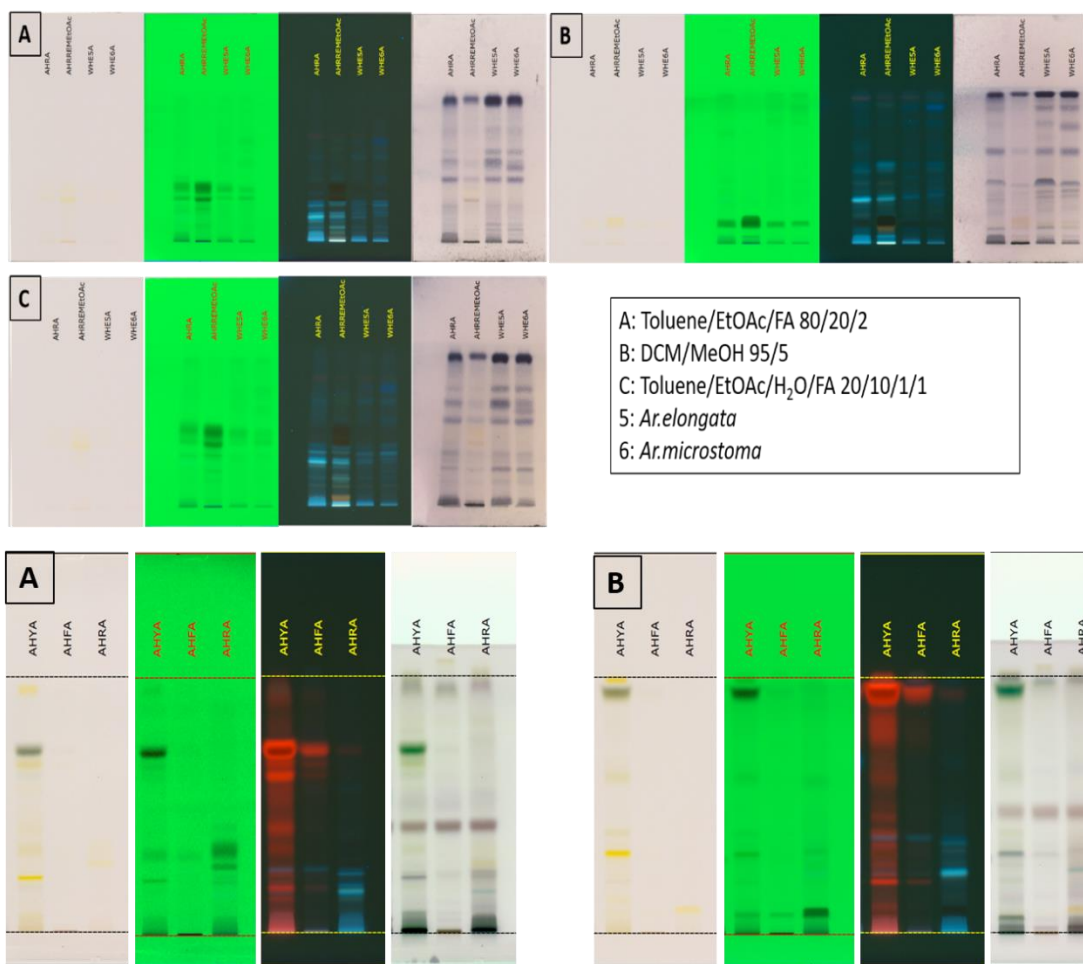
Πίνακας 25. Αποδόσεις εκχυλίσεων των ειδών αριστολόχιας

Φυτικό είδος	Φυτικό υλικό	Διαλύτης εκχύλισης	Κωδικός εκχυλίσματος	Βάρος εκχυλίσματος	Απόδοση εκχύλισης
<i>A. hirta</i>	ρίζα	DCM	AHRA	0.4359 g	0.85%

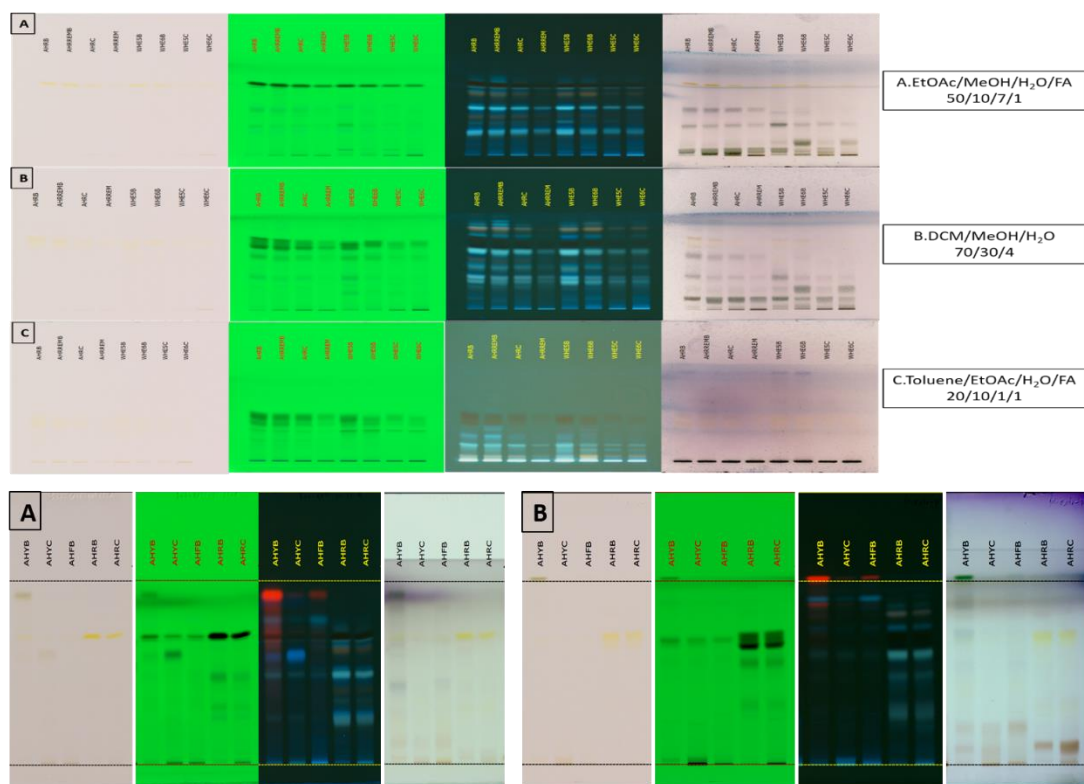
<i>A. hirta</i>	ρίζα	MeOH	AHRB	3.8761 g	7.59%
<i>A. hirta</i>	ρίζα	MeOH/H ₂ O 50/50	AHRC	5.7339 g	11.22%
<i>A. hirta</i>	υπέργεια	DCM	AHYA	1.1115 g	2.21%
<i>A. hirta</i>	υπέργεια	MeOH	AHYB	5.2811 g	10.51%
<i>A. hirta</i>	υπέργεια	MeOH/H ₂ O 50/50	AHYC	8.8324 g	17.58%
<i>A. hirta</i>	άνθη	EtOAc	AHFA	0.1600 g	2.56%
<i>A. hirta</i>	άνθη	MeOH	AHFB	1.4138 g	22.62%
<i>A. elongata</i>	ρίζα	DCM	AERA	0.7025 g	1.40%
<i>A. elongata</i>	ρίζα	EtOH	AERB	1.9116 g	3.82%
<i>A. elongata</i>	ρίζα	EtOH/H ₂ O 50/50	AERC	6.9996g	14.00%
<i>A. microstoma</i>	ρίζα	DCM	AMRA	0.2150 g	0.83%
<i>A. microstoma</i>	ρίζα	EtOH	AMRB	0.9307 g	3.60%
<i>A. microstoma</i>	ρίζα	EtOH/H ₂ O 50/50	AMRC	3.7604 g	14.50%

Πέρα από την κλασική εκχύλιση, πραγματοποιήθηκε η παρασκευή μιας παραδοσιακής θεραπευτικής συνταγής που περιέχει ρίζα αριστολόχιας και χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση κακοηθειών. Αναλυτικότερα, 50 g σκόνης της ρίζας της *A. hirta* αναμείχθηκαν με 1.5 λίτρο απεσταγμένου νερού και ακολούθησε βρασμός μέχρι το μισό του όγκου. Ο βρασμός είχε διάρκεια 45 λεπτά και ο όγκος που παραλήφθηκε ήταν 600mL. Ακολούθως έγινε διήθηση με σουρωτήρι, φυγοκέντρηση και το υγρό παρασκεύασμα διηθήθηκε με χάρτινο φίλτρο και συμπυκνώθηκε (εκχύλισμα AHREM). Το υπόλειμμα του φυτικού υλικού εκχυλίστηκε διαδοχικά με μεθανόλη (εκχύλισμα AHREMB) και οξικό αιθυλεστέρα (εκχύλισμα AHREMEtOAc) σε λουτρό υπερήχων, με 2 κύκλους εκχύλισης για κάθε διαλυτικό μέσο διάρκειας 30 λεπτών ο καθένας χωρίς θέρμανση. Το παρασκεύασμα λυοφιλοποιήθηκε.

Το χημικό φορτίο όλων των παραληφθέντων εκχυλισμάτων ελέγχθηκε με υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας (LC-MS) (βλ. παράρτημα) και με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) όπως φαίνεται παρακάτω:



Εικόνα 88. Χρωματογραφήματα HPTLC των άπολων εκχυλισμάτων των ειδών αριστολόχιας σε συστήματα ανάπτυξης: (A) Toluene/EtOAc/FA 80/20/2, (B) DCM/MeOH 95/5 και (C) Toluene/EtOAc/H₂O/FA 20/10/1/1. Επάνω: εκχυλίματα-παρασκευάσματα των ριζών της αριστολόχιας (και τα 3 είδη) Κάτω: εκχυλίματα ριζών, υπέργειων τμημάτων και ανθέων της *Aristolochia hirta*



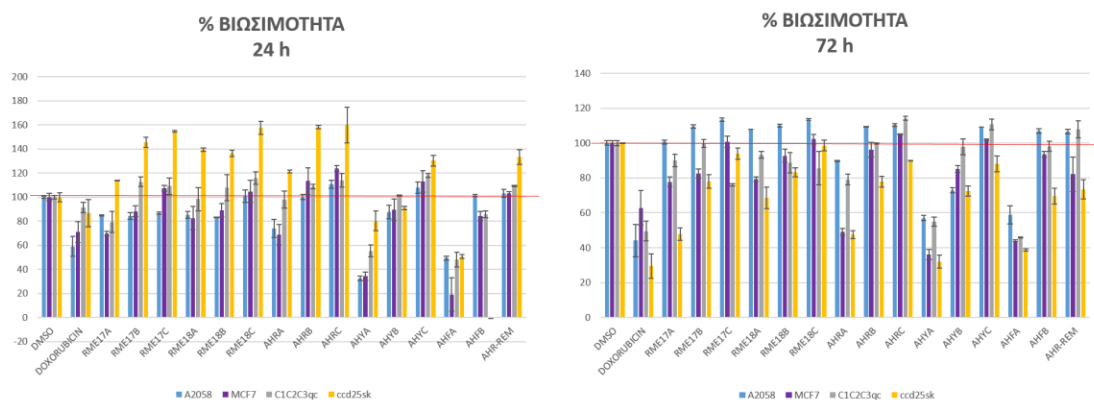
Εικόνα 89. Χρωματογραφήματα ΗΡΤΛC των πολικών εκχυλισμάτων της αριστολόχιας σε συστήματα ανάπτυξης: (Α) EtOAc/MeOH/ H₂O/FA 50/10/7/1, (Β) DCM/MeOH/H₂O 70/30/4 και (C) Toluene/EtOAc/H₂O/FA 20/10/1/1. Επάνω: εκχυλίσματα-παρασκευάσματα των ριζών της αριστολόχιας (και τα 3 είδη) Κάτω: εκχυλίσματα ριζών, υπέργειων τμημάτων και ανθέων της *Aristolochia hirta*

10.3.2 Βιολογική αξιολόγηση ολικών εκχυλισμάτων

Όπως έχει αναφερθεί στη γενικότερη ενότητα της βιολογικής αξιολόγησης των εκχυλισμάτων, μεταξύ των εκχυλισμάτων του γένους *Aristolochia*, μόνο το υδατομεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων της *A. hirta* (AHYC) παρουσίασε ισχυρή αναστολή της AChE (μέθοδος NA-FBB), με ποσοστό $96.77 \pm 0.19\%$, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα των ριζών των *A. hirta*, *A. microstoma* και *A. elongata* τα οποία αποδείχτηκαν μη δραστικά. Στις άλλες δύο δοκιμασίες αναστολής της Hyal και της sPLA₂ κανένα από τα εκχυλίσματα της αριστολόχιας δεν παρουσίασε αξιοσημείωτη δράση.

Τα αποτελέσματα των ελέγχων κυτταροτοξικότητας παρουσιάζονται στο παρακάτω ραβδόγραμμα:

Aristolochia spp.



Εικόνα 90. Επίδραση των εκχυλισμάτων των *Aristolochia spp.* στη βιωσιμότητα των κυττάρων A2058, MCF7, C1C2C3qc και CCD-25Sk συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα, δηλαδή την ομάδα των κυττάρων που επώαστηκαν με 0,2% DMSO. Τα κύτταρα επώαστηκαν με τα εκχυλίσματα (συγκέντρωση 250μg/mL) για 24 και 72 ώρες προτού εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. Οι αριθμοί των κυττάρων παρουσιάζονται ως % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± SEM. Ως πρότυπη ουσία χρησιμοποιήθηκε η δοξορουβικίνη. RME17A, RME17B, RME17C: DCM, EtOH, EtOH/H₂O 50/50 εκχυλίσματα *Ar. elongata*, RME18A, RME18B, RME18C: DCM, EtOH, EtOH/H₂O 50/50 εκχυλίσματα *Ar. microstoma*

Στο ραβδόγραμμα της % κυτταρικής βιωσιμότητας που προκύπτει από τις δοκιμασίες των 24 ωρών, από τα εκχυλίσματα της *A. elongata*, το εκχύλισμα RME17A/AERA εμφανίζει αξιοσημείωτη μείωση του αριθμού των MCF7 και C1C2C3qc, συγκριτικά με τη δοξορουβικίνη, χωρίς να συμβαίνει το ίδιο με τα φυσιολογικά CCD-25Sk κύτταρα. Κανένα από τα εκχυλίσματα της *A. microstoma* δεν παρουσίασε σημαντική μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στις δοκιμασίες των 24 h. Ανάμεσα στα εκχυλίσματα της *A. hirta*, το AHRA εμφάνισε μια μικρή μείωση στη βιωσιμότητα των MCF7, χωρίς κυτταροτοξικότητα στα φυσιολογικά, η οποία όμως δε διαφέρει πολύ από το αποτέλεσμα της δοξορουβικίνης. Από τα υπέργεια τμήματα, το άπολο AHYA ήταν τοξικό και στις τρεις καρκινικές σειρές, με διαφορά από τη δοξορουβικίνη, και με μικρή τοξικότητα στα φυσιολογικά κύτταρα. Το ίδιο παρατηρείται και με το άπολο εκχύλισμα των ανθέων του είδους, AHFA, το οποίο ήταν περισσότερο τοξικό συγκριτικά με τη δοξορουβικίνη, και στις τρεις καρκινικές σειρές, με ελαφρώς μεγαλύτερη τοξικότητα στη φυσιολογική σειρά. Το πολικό εκχύλισμα των ανθέων της *A. hirta* προκάλεσε τη μεγαλύτερη τοξικότητα στα φυσιολογικά κύτταρα. Το παρασκεύασμα της ρίζας της αριστολόχιας (AHREM) δεν παρουσίασε κυτταροτοξικότητα στα καρκινικά κύτταρα εντός 24 ωρών.

Στο ραβδόγραμμα της % κυτταρικής βιωσιμότητας που προκύπτει από τις δοκιμασίες των 72 ωρών φαίνεται ότι κανένα από τα εκχυλίσματα των *A. elongata* και *A. microstoma* δεν προκάλεσε σημαντική κυτταροτοξικότητα. Από τα εκχυλίσματα της *A. hirta* αξιοσημείωτη

κυτταροτοξικότητα στα MCF7 κύτταρα διατήρησε το AHRA, χωρίς να επηρεάζει τα φυσιολογικά κύτταρα. Τα άπολα εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων του είδους, AHYA και των ανθέων, AHFA, εμφάνισαν μεγαλύτερη τοξικότητα, συγκριτικά με τη δοξορουβικίνη, έναντι των καρκινικών κυττάρων του μαστού και του ήπατος, με την ίδια επίδραση (σε σχέση με τη δοξορουβικίνη) στα φυσιολογικά κύτταρα. Τέλος, επισημαίνεται ότι το μεθανολικό εκχύλισμα των ανθέων της *A. hirta* δεν εμφάνισε τοξικότητα στα φυσιολογικά κύτταρα. Το παρασκεύασμα της ρίζας της αριστολόχιας (AHREM) δεν παρουσίασε κυτταροτοξικότητα στα καρκινικά κύτταρα εντός 72 ωρών.

10.3.3 Κλασμάτωση εκχυλισμάτων με φυγόκεντρο χρωματογραφία κατανομής (FCPC)

Τα υδατοαλκοολικά εκχυλίσματα των ριζών και των υπέργειων τμημάτων της *A. hirta* μελετήθηκαν περαιτέρω καθώς παρουσίασαν το μεγαλύτερο (α) φυτοχημικό ενδιαφέρον, καθώς δεν είναι πολλές οι αναφορές στη βιβλιογραφία για το συγκεκριμένο είδος, και (β) φαρμακολογικό ενδιαφέρον, όσον αφορά τα εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων που αξιολογήθηκαν στις διάφορες βιοδοκιμασίες.

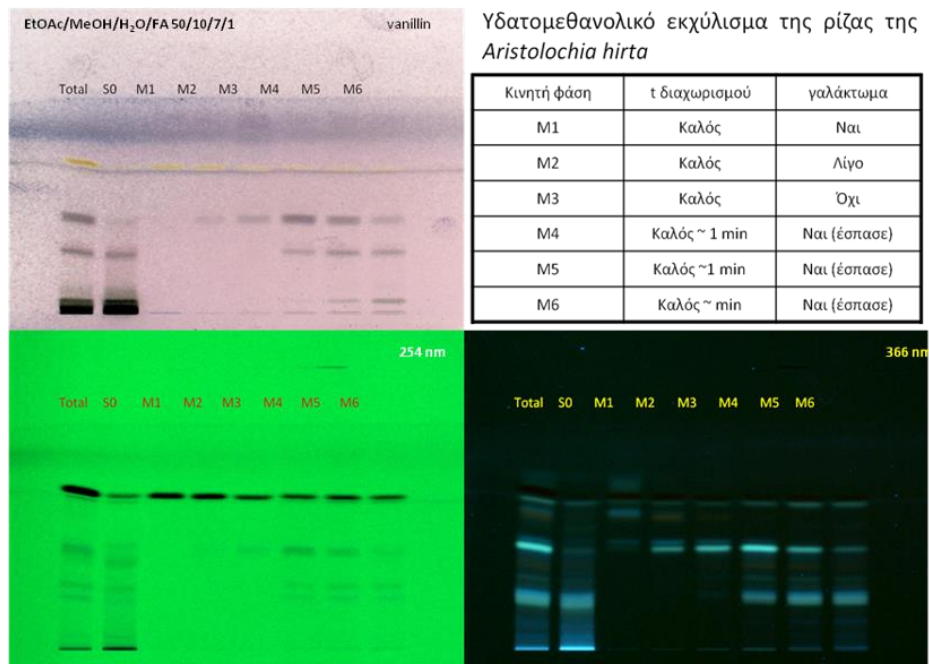
- ❖ Υδατομεθανολικό εκχύλισμα των ριζών του είδους *Aristolochia hirta* (Κωδικός εκχυλίσματος: AHRC):

Επιλογή συστήματος:

Με βάση την πολικότητα και τη διαλυτότητα του εκχυλίσματος AHRC δοκιμάστηκε ένα σύνολο συστημάτων βαθμιδωτής έκλουσης βασιζόμενο στα συστήματα διαλυτών Oka¹⁴³, τα οποία περιέχουν 5 διαλύτες (επτάνιο (Heptane), οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc), βουτανόλη (BuOH), μεθανόλη (MeOH), νερό (H₂O)) και γενικά χαρακτηρίζονται από- ικανοποιητικό, γρήγορο και σε καλή αναλογία διαχωρισμό των δύο φάσεων. Το σύστημα βαθμιδωτής έκλουσης και τα αποτελέσματα της δοκιμής φαίνονται παρακάτω.

Πίνακας 26. Ομάδα συστημάτων βαθμιδωτής έκλουσης που δοκιμάστηκε για την κλασμάτωση του εκχυλίσματος AHRC με την τεχνική FCPC

<u>Σύστημα</u>	Heptane	EtOAc	BuOH	MeOH	H ₂ O
<u>S1</u>	2.0	4.0	0.0	1.0	5.0
<u>S2</u>	1.0	5.0	0.0	1.0	5.0
<u>S3</u>	1.0	4.5	0.5	1.0	5.0
<u>S4</u>	0.5	4.0	1.5	1.0	5.0
<u>S5</u>	0.5	3.0	2.5	1.0	5.0
<u>S6</u>	0.5	2.0	4.5	1.0	5.0



Εικόνα 91. Χρωματογραφήματα HPTLC για την επιλογή κατάλληλου συστήματος διαλυτών για το υδατομεθανολικό εκχύλισμα της ρίζας της *Aristolochia hirta* σε σύστημα ανάπτυξης EtOAc/MeOH/H₂O/FA 50/10/7/1, Total: εκχύλισμα AHRC, S0: στατική φάση, M1: πρώτη κινητή φάση, M2: δεύτερη κινητή, M3: τρίτη κινητή, M4: τέταρτη κινητή φάση, M5: πέμπτη κινητή, M6: έκτη κινητή φάση

Η συγκεκριμένη αλληλουχία διαλυτών επέφερε ικανοποιητικά αποτελέσματα τόσο ως προς το διαχωρισμό των δύο φάσεων, κινητής και στατικής, όσο και ως προς την κατανομή και το διαχωρισμό των συστατικών του εκχυλίσματος. Τελικά το εκχύλισμα κλασματώθηκε με

διαδικασία βαθμιδωτής έκλουσης (dual mode) με τη συγκεκριμένη αλληλουχία διαλυτών και με προσθήκη 5% οξικού οξέος (AA) στη στατική (κάτω) φάση προκειμένου να περιοριστεί ο ιονισμός των αριστολοχικών οξέων, να μειωθεί η κατανομή τους στη στατική φάση και να εκλουστούν από τη χρωματογραφική στήλη.

Πειραματική διαδικασία:

Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε συσκευή υδροστατικού τύπου (CPC KROMATON). Αρχικά η στήλη χωρητικότητας 1000 mL πληρώθηκε με την στατική φάση MeOH/H₂O (5% AA) 1/5. Ποσότητα 5.6 g του εκχυλίσματος διαλύθηκαν σε 20 mL στατικής φάσης και τοποθετήθηκαν σε loop χωρητικότητας 30 mL. Στη συνέχεια διοχετεύθηκε η πρώτη κινητή φάση Heptane/EtOAc 2/4. Οι συνθήκες του πειράματος φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 27. Συνθήκες FCPC κλασμάτωσης του εκχυλίσματος AHRC

Βάρος εκχυλίσματος	5.6 g
Διαλύτες	Heptane/EtOAc/BuOH/MeOH/H ₂ O (5% AA)
Στροφές	700 rpm
Ροή	8 mL/min
Κινητή φάση	πάνω φάση (οργανική)
Στατική φάση	κάτω φάση (υδατική)
Ρύθμιση	Ascending

Η εξισορρόπηση του συστήματος πραγματοποιήθηκε στην αναλογία 750mL στατικής φάσης : 250 mL κινητής φάσης. Συλλέχθηκαν 139 κλάσματα, όγκου 50 mL το καθένα, τα οποία ελέγχθηκαν ως προς το χημικό τους φορτίο με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Επιπλέον, συλλέχθηκε το κλάσμα έκπλυσης της στήλης με την ακετόνη. Για τα πρώτα κλάσματα, όπου εκλούσθηκε η μεγαλύτερη ποσότητα αριστολοχικών οξέων, αλλά και για τα τελευταία όπου υπήρχαν διφασικά συστήματα και η οργανική φάση είχε έντονο κίτρινο χρώμα, χαρακτηριστικό της παρουσίας αριστολοχικών οξέων, επιλέχθηκε για τη μέθοδο TLC το εξής σύστημα ανάπτυξης: Toluene/EtOAc/H₂O/FA 20:10:1:1, το οποίο θεωρείται κατάλληλο για την αναγνώριση των αριστολοχικών οξέων²¹¹, ενώ οι TLC με τα υπόλοιπα κλάσματα αναπτύχθηκαν με το σύστημα DCM/MeOH/H₂O 70:30:4. Μετά από συνενώσεις προέκυψαν 35 κλάσματα. Η απόδοση της φυγόκεντρου χρωματογραφίας κατανομής(FCPC) υπολογίσθηκε 97,9%.

Πίνακας 28. Συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν από την FCPC κλασμάτωση του εκχυλίσματος ΑΗΡC

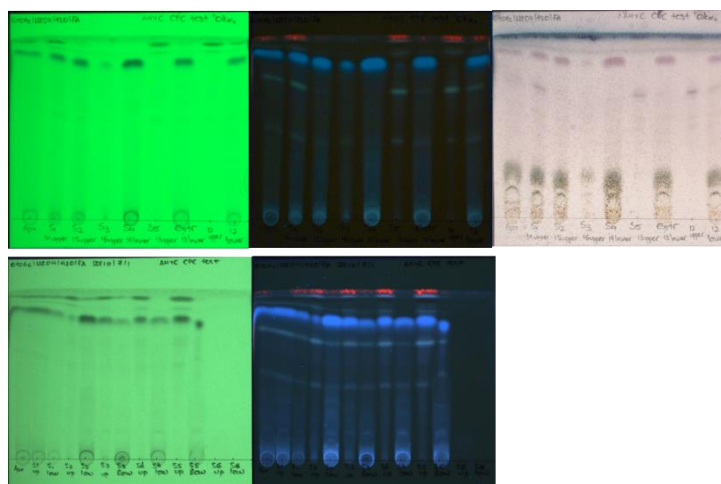
ΚΩΔΙΚΟΣ CPC ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΒΑΡΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ
AHRC-CPC 1	42.1 mg
AHRC-CPC 2-4	103.2 mg
AHRC-CPC 5-9	33.5 mg
AHRC-CPC 10-11	7.2 mg
AHRC-CPC 12-14	8.1 mg
AHRC-CPC 15-19	9.3 mg
AHRC-CPC 20-28	19.2 mg
AHRC-CPC 29-34	12.7 mg
AHRC-CPC 35-42	13.1 mg
AHRC-CPC 43-47	9.7 mg
AHRC-CPC 48-53	12.0 mg
AHRC-CPC 54-55	4.3 mg
AHRC-CPC 56-60	10.6 mg
AHRC-CPC 61	4.3 mg
AHRC-CPC 62	6.8 mg
AHRC-CPC 63-66	22.0 mg
AHRC-CPC 67-70	130.0 mg
AHRC-CPC 71-72	63.7 mg
AHRC-CPC 73-74	24.4 mg
AHRC-CPC 75-78	20.9 mg
AHRC-CPC79-80	8.7 mg
AHRC-CPC 81-83	13.8 mg
AHRC-CPC 84	5.4 mg
AHRC-CPC 85	6.9 mg
AHRC-CPC 86-87	22.1 mg
AHRC-CPC 88	18.6 mg
AHRC-CPC 89	28.5 mg
AHRC-CPC 90-92	123.2 mg
AHRC-CPC 93	29.7 mg
AHRC-CPC 94-96	89.6 mg
AHRC-CPC 97-98	37.9 mg
AHRC-CPC 99-103	4216 mg

AHRC-CPC 104-106	151.1 mg
AHRC-CPC 107-clear	79.6 mg
AHRC-CPC up	81.6 mg
AHRC-CPC waste	10.0 mg

- ❖ Υδατομεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του είδους *Aristolochia hirta* (Κωδικός εκχυλίσματος: AHYC):

Επιλογή συστήματος:

Δοκιμάστηκαν τα εξής συστήματα ισοκρατικής έκλουσης EtOAc/BuOH/H₂O (12(S1): EtOAc/BuOH/H₂O 2.0/0.5/2.5, 13(S2): EtOAc/BuOH/H₂O 1.5/1.0/2.5, 14(S3): EtOAc/BuOH/H₂O 1.0/1.5/2.5, 15(S4): EtOAc/BuOH/H₂O 0.5/2.0/2.5 και 16(S5): EtOAc/BuOH/H₂O 0/2.5/2.5).



Εικόνα 92. TLC κατανομή συστατικών του AHYC με χρήση των δοκιμαστικών συστημάτων για την FCPC κλασμάτωση του εκχυλίσματος. Σύστημα ανάπτυξης EtOAc/MeOH/H₂O/FA 50/10/7/1

Στην περίπτωση του συστήματος 12(S1) η αναλογία των 2 φάσεων ήταν 1:1 και σχηματίστηκε μόνιμο γαλάκτωμα. Στο 13(S2) σύστημα η αναλογία φάσεων ήταν πάλι 1:1, ενώ ο διαχωρισμός των φάσεων ήταν πιο γρήγορος και το γαλάκτωμα που σχηματίστηκε λιγότερο. Ακόμη καλύτερη εικόνα έδωσε το 14(S3), ενώ τα 15(S4) και 16(S5) εμφάνισαν πιο αργό διαχωρισμό φάσεων. Επισημαίνεται ότι το εκχύλισμα ήταν καλά διαλυτό στην κάτω φάση και στις 4 περιπτώσεις.

Ακόμη δοκιμάστηκαν άλλα 5 ισοκρατικά συστήματα τα οποία είναι (1) Chloroform/MeOH/H₂O 7/13/8, (2) Butanol/EtOH/H₂O 4/1/4, (3) Butanol/Acetic acid/H₂O 4/1/5, (4) Butanol/MTBE/ACN/H₂O 3/1/1/5 (με ή χωρίς 0.1% A.A.) και (5) Butanol/MTBE/ACN/H₂O

2/2/1/5 (με ή χωρίς 0.1% A.A.). Στο σύστημα (1) η αναλογία φάσεων ήταν 1:3 (lower:upper), αλλά σχηματίστηκε γαλάκτωμα. Στο σύστημα (2) παρατηρήθηκε καλός διαχωρισμός φάσεων, δεν υπήρχε έντονο γαλάκτωμα και η αναλογία φάσεων ήταν 1:3 (lower:upper). Στο σύστημα (3) η αναλογία φάσεων ήταν 1:1, ο διαχωρισμός φάσεων σχετικά καλός και δεν υπήρχε γαλάκτωμα. Στο σύστημα (4) ο διαχωρισμός ήταν πιο αργός, το γαλάκτωμα διαλυόταν δύσκολα και η αναλογία φάσεων ήταν 1:1. Στο σύστημα (5) η εικόνα ήταν σχεδόν ίδια με το σύστημα (4). Τελικά το εκχύλισμα κλασματώθηκε ισοκρατικά με το σύστημα (4), το οποίο έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα στον προαναφερόμενο έλεγχο.

Πειραματική διαδικασία:

Σκοπός της κλασμάτωσης του εκχυλίσματος ΑΗΥC ήταν να μελετηθούν οι ουσίες που δεν ανήκουν στα αριστολογικά οξέα, δεν συναντώνται στις ρίζες και πιθανόν ευθύνονται για τη δράση του εκχυλίσματος στην αναστολή της ΑChE. Έτσι λοιπόν, προτού γίνει η κλασμάτωση του εκχυλίσματος ΑΗΥC πραγματοποιήθηκε υγρή-υγρή εκχύλιση με χλωροφόρμιο-νερό με σκοπό την απομάκρυνση του κλάσματος των αριστολογικών οξέων. Κατόπιν τα 5.6 g του υπόλοιπου εκχυλίσματος κλασματώθηκαν ισοκρατικά με το σύστημα n-Butanol/MTBE/ACN/H₂O 3/1/1/5 (0.1% A.A.) σε συσκευή υδροστατικού τύπου (CPC KROMATON) με στήλη χωρητικότητας 1000 mL. Το εκχύλισμα ήταν πολύ καλά διαλυτό στη στατική φάση και τοποθετήθηκε σε loop χωρητικότητας 30 mL. Πρώτα πραγματοποιήθηκε η φόρτωση του δείγματος και μετά προωθήθηκε η κινητή φάση. Οι συνθήκες του πειράματος φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 29. Συνθήκες FCPC κλασμάτωσης του εκχυλίσματος ΑΗΥC

Βάρος εκχυλίσματος	5.6 g
Διαλύτες	n- Butanol/MTBE/ACN/H ₂ O 3/1/1/5 (0.1% A.A.)
Στροφές	750 rpm
Ροή	6 mL/min
Κινητή φάση	πάνω φάση (οργανική)
Στατική φάση	κάτω φάση (υδατική)
Ρύθμιση	Ascending

Συλλέχθηκαν 55 κλάσματα, όγκου 20 mL το καθένα, τα οποία ελέγχθηκαν ως προς το χημικό τους φορτίο με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Μετά από συνενώσεις προέκυψαν 35 κλάσματα. Επισημαίνεται πως οι συνενώσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν λίγες, καθώς τα

κλάσματα μελετήθηκαν στη συνέχεια με τη μεθοδολογία HetCA, στην οποία θα πρέπει να διατηρείται όσο το δυνατόν η διακύμανση της συγκέντρωσης των συστατικών μεταξύ των κλασμάτων.

Πίνακας 30. Συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν από την FCPC κλασμάτωση του εκχυλίσματος ΑΗΥC

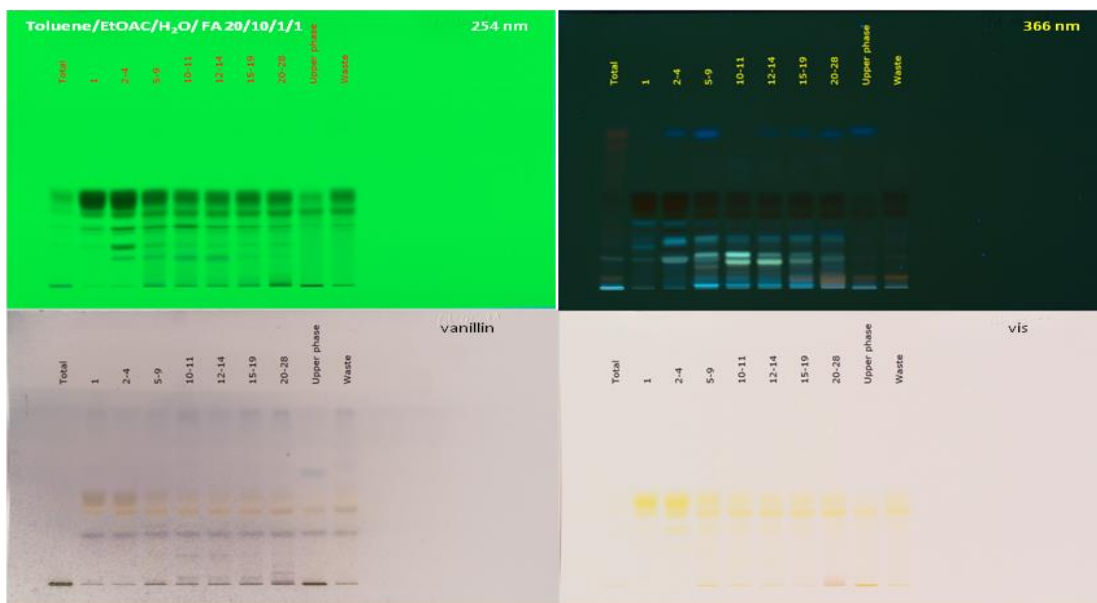
ΚΩΔΙΚΟΣ CPC	ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΒΑΡΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ (mg)
ΑΗΥC CHCl ₃ PHASE	ΑΗΥC_01	35.7
ΑΗΥC FR1	ΑΗΥC_02	37
ΑΗΥC FR2	ΑΗΥC_03	45.5
ΑΗΥC FR3	ΑΗΥC_04	31.8
ΑΗΥC FR4	ΑΗΥC_05	49.9
ΑΗΥC FR5	ΑΗΥC_06	46.9
ΑΗΥC FR6	ΑΗΥC_07	48.8
ΑΗΥC FR7	ΑΗΥC_08	38.9
ΑΗΥC FR8	ΑΗΥC_09	26.1
ΑΗΥC FR9	ΑΗΥC_10	21.9
ΑΗΥC FR10	ΑΗΥC_11	19.3
ΑΗΥC FR11	ΑΗΥC_12	19.3
ΑΗΥC FR12	ΑΗΥC_13	20.9
ΑΗΥC FR13	ΑΗΥC_14	19.2
ΑΗΥC FR14	ΑΗΥC_15	16.2
ΑΗΥC FR15	ΑΗΥC_16	14
ΑΗΥC FR16	ΑΗΥC_17	11.1
ΑΗΥC FR17	ΑΗΥC_18	8.8
ΑΗΥC FR18	ΑΗΥC_19	8.3
ΑΗΥC FR19	ΑΗΥC_20	6.9
ΑΗΥC FR20	ΑΗΥC_21	6.1
ΑΗΥC FR21	ΑΗΥC_22	6.1
ΑΗΥC FR22-23	ΑΗΥC_23	10.2
ΑΗΥC FR24-30	ΑΗΥC_24	24.5
ΑΗΥC FR31-35	ΑΗΥC_25	15.9
ΑΗΥC FR36-41	ΑΗΥC_26	20.7
ΑΗΥC FR42-43	ΑΗΥC_27	9.6
ΑΗΥC FR44-46	ΑΗΥC_28	39.9

AHYC FR47-49	AHYC_29	67.4
AHYC FR50	AHYC_30	366.7
AHYC FR51	AHYC_31	1715.8
AHYC FR52	AHYC_32	1569.7
AHYC FR53	AHYC_33	915
AHYC FR54	AHYC_34	148.3
AHYC FR55-END	AHYC_35	42.4

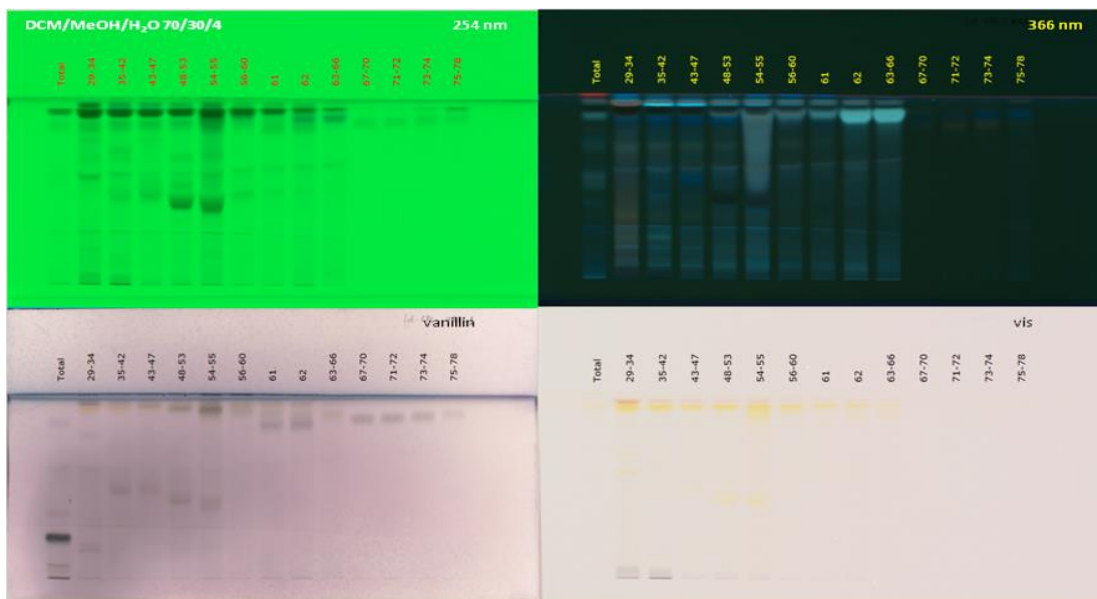
10.3.4 Έλεγχος χημικού φορτίου FCPC κλασμάτων με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας

- ❖ Υδατομεθανολικό εκχύλισμα των ριζών του είδους *Aristolochia hirta* (Κωδικός εκχυλίσματος: AHRC):

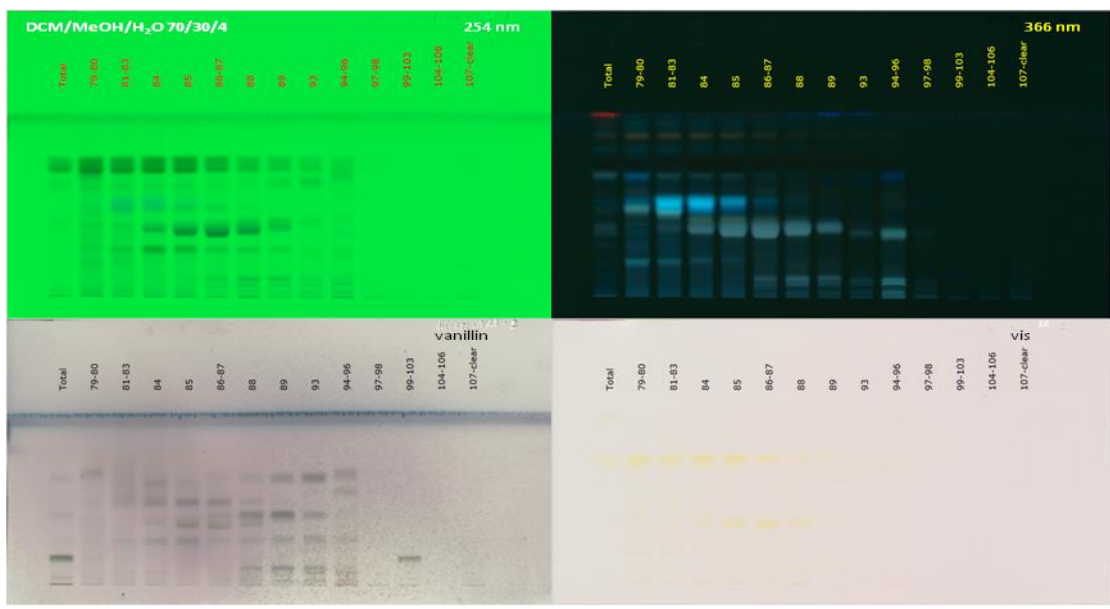
Για τον ποιοτικό έλεγχο των συνενωμένων FCPC κλασμάτων που προέκυψαν από το εκχύλισμα AHRC χρησιμοποιήθηκε η τεχνική HPTLC. Σε κάθε πλάκα έγινε απόθεση 15 µL από κάθε διάλυμα κλάσματος (μετά από συνένωση) συγκέντρωσης 1 mg/mL στον κατάλληλο διαλύτη ή μείγμα διαλυτών. Τα συστήματα ανάπτυξης των πλακών επιλέχθηκαν με τρόπο τέτοιο ώστε να είναι δυνατή η παρατήρηση του μεγαλύτερου ποσοστού των μεταβολιτών που περιέχονται στο εκάστοτε κλάσμα. Οι ανεπτυγμένες πλάκες παρατηρήθηκαν και φωτογραφήθηκαν στα μήκη κύματος 254 και 366 nm, ενώ μετά τη σάρωση των χρωματογραφημάτων και τη λήψη των φασμάτων απορρόφησης στα μήκη κύματος 200, 254, 280 και 366 nm, πραγματοποιήθηκε η εμβάπτιση των πλακών σε διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση. Παρακάτω παρουσιάζονται οι πλάκες TLC των κλασμάτων.



Εικόνα 93. Χρωματογραφήματα HPTLC των συνενώσεων των κλασμάτων που προέκυψαν από τη φυγόκεντρο χρωματογραφία κατανομής (FCPC) σε σύστημα ανάπτυξης Toluene/EtOAc/H₂O/FA 20/10/1/1, total: το αρχικό υδατομεθανολικό εκχύλισμα της ρίζας της *Aristolochia hirta* (AHRC), Upper phase: οι συνενώσεις των άνω φάσεων των τελευταίων 18 κλασμάτων, τα οποία ήταν διφασικά, Waste: το κλάσμα του διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό της στήλης.

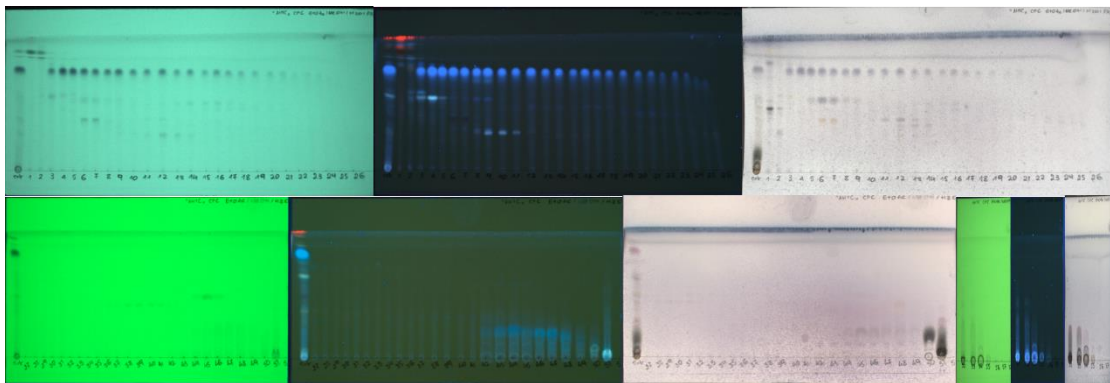


Εικόνα 94. Χρωματογραφήματα HPTLC των συνενώσεων των κλασμάτων που προέκυψαν από τη φυγόκεντρο χρωματογραφία κατανομής (FCPC) σε σύστημα ανάπτυξης DCM/MeOH/H₂O 70/30/4, total: το αρχικό υδατομεθανολικό εκχύλισμα της ρίζας της *Aristolochia hirta* (AHRC).



Εικόνα 95. Χρωματογραφήματα HPTLC των συνενώσεων των κλασμάτων που προέκυψαν από τη φυγόκεντρο χρωματογραφία κατανομής (FCPC) σε σύστημα ανάπτυξης DCM/MeOH/H₂O 70/30/4, total: το αρχικό υδατομεθανολικό εκχύλισμα της ρίζας της *Aristolochia hirta* (AHRC).

- ❖ Υδατομεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του είδους *Aristolochia hirta* (Κωδικός εκχυλίσματος: AHYC):



Εικόνα 96. TLC των FCPC κλασμάτων που παραλήφθηκαν από το εκχύλισμα AHYC (Σύστημα ανάπτυξης: EtOAc:MeOH:H₂O:FA 50:10:7:1)

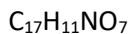
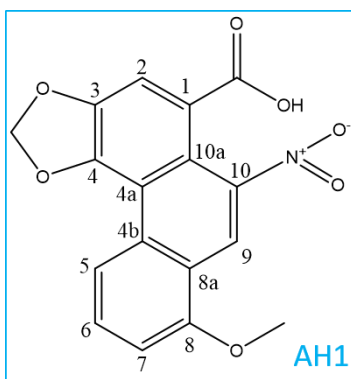
10.3.5 Απομόνωση και ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών

- ❖ Υδατομεθανολικό εκχύλισμα των ριζών του είδους *Aristolochia hirta* (Κωδικός εκχυλίσματος: AHRC):

Απευθείας στα κλάσματα που προέκυψαν από το χρωματογραφικό διαχωρισμό με την τεχνική FCPC εντοπίστηκαν οι παρακάτω ουσίες:

1. Αριστολοχικό οξύ I (Κλάσμα AHRC 2-4) (AH1)
2. Αριστολοχικό οξύ II (Κλάσμα AHRC 2-4) (AH2)
3. Αριστολοχικό οξύ IV (Κλάσμα AHRC 2-4) (AH3)
4. Αριστολακτάμη IIIA-N-β-D-γλυκοσίδης (Κλάσμα AHRC 63-66) (AH4)
5. 6-O-π-κουμαροϋλο-α-D-γλυκοκυρανόση (Κλάσμα AHRC 67-70) (AH5)
6. 6-O-π-κουμαροϋλο-β-D-γλυκοκυρανόση (Κλάσμα AHRC 67-70) (AH6)

Ο μεταβολίτης AH1 ταυτοποιήθηκε ως το αριστολοχικό οξύ I. Πρόκειται για ένα χαρακτηριστικό παράγωγο του γένους, με μοριακό βάρος 341.27 g/mol. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα $^1\text{H-NMR}$, COSY, HSQC-DEPT, HMBC σε διαλύτη $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ και σύγκριση με τη βιβλιογραφία²¹².



Πίνακας 31. Φασματοσκοπικά δεδομένα του αριστολοχικού οξέος I ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 600 MHz)

Θέση	$^1\text{H-NMR}$ [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]	$^{13}\text{C-NMR}$ (ppm)
1	-	124.51
2	7.82 (1H, s)	112.02
3	-	146.00
4	-	146.21
4a	-	116.90
4b	-	130.00
5	8.67 (1H, d, $J = 8.2$ Hz)	118.61
6	7.87 (1H, t, $J = 8.2$ Hz)	131.72
7	7.39 (1H, d, $J = 8.2$ Hz)	109.03
8	-	156.05

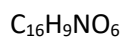
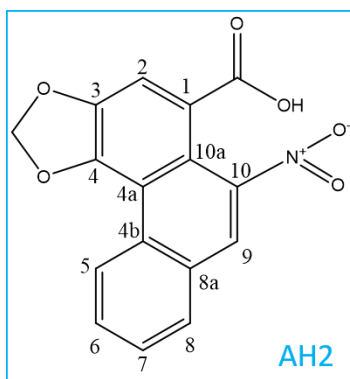
8a	-	118.04
9	8.60 (1H, s)	119.76
10	-	145.78
10a	-	116.94
C=O	-	168.05
3,4-OCH₂O	6.51 (2H, s)	103.21
8-OMe	4.07 (3H, s)	56.32

Στο φάσμα ¹H-NMR παρατηρείται μια διπλή κορυφή στα 8.67 ppm ($J = 8.2$ Hz) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 5 του μορίου, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 118.61 ppm (HMOC). Μια απλή κορυφή στα 8.60 ppm αντιστοιχεί σε πρωτόνιο του οποίου ο άνθρακας συντονίζεται στα 119.76 ppm και πρόκειται για το πρωτόνιο 9. Στα 7.82 ppm στο φάσμα ¹H-NMR παρατηρείται μια απλή κορυφή που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 2 του μορίου, του οποίου ο άνθρακας συντονίζεται στα 112.02 ppm. Μια τριπλή κορυφή που παρατηρείται στα 7.87 ppm ($J = 8.2$ Hz) αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 6, ενώ ο άνθρακας του πρωτονίου αυτού συντονίζεται στα 131.72 ppm. Το πρωτόνιο της θέσης 7 συντονίζεται στα 7.39 ppm, όπου παρατηρείται μια διπλή κορυφή ($J = 8.2$ Hz), ενώ από στο φάσμα HMOC παρατηρήθηκε πως ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 109.03 ppm. Μια απλή κορυφή στα 6.51 ppm, που ολοκληρώνει για 2 πρωτόνια, αντιστοιχεί στα δυο πρωτόνια της μεθυλενοδιόξυ- ομάδας του μορίου. Από τα φάσματα δύο διαστάσεων παρατηρείται πως ο άνθρακας αυτών των πρωτονίων συντονίζεται στα 103.21 ppm. Τέλος, παρατηρείται μια απλή κορυφή στα 4.07 ppm, η οποία ολοκληρώνει για 3 πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια της μεθόξυ- ομάδας του μορίου. Στο φάσμα HSQC-DEPT φαίνεται ότι ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 56.32 ppm.

Το αριστολοχικό οξύ I απομονώθηκε πρώτη φορά από την *A. clematitis* το 1943 από τους Rosemud και Reichstein, ενώ η δομή του ταυτοποιήθηκε αργότερα το 1956 από τους Tomita και Sasagawa²¹². Το αριστολοχικό οξύ I έχει απομονωθεί από πλήθος ειδών του γένους *Aristolochia*, ενώ ενδεικτικά αναφέρονται μερικά είδη: *A. auricularia*, *A. bracteata*, *A. clematitis*, *A. cretica*, *A. elegans*, *A. indica*, *A. longa*, *A. manshuriensis* και *A. mollissima*. Επίσης, έχει απομονωθεί και από είδη του γένους *Asarum*, όπως *A. canadense* και *A. Caudatum*, τα οποία επίσης ανήκουν στην οικογένεια Aristolochiaceae. Έχει ανιχνευθεί και από ζωικές πηγές, όπως οι

πεταλούδες των ειδών *Baltus philenor* και *Zerynthia polyxena*, των οποίων οι προνύμφες τρέφονται με είδη του γένους *Aristolochia*^{213 214}. Για το αριστολοχικό οξύ I έχει αναφερθεί πληθώρα δράσεων, όπως αντιφλεγμονώδης, κυτταροτοξική, αντισπασμωδική, αντιαιμοπεταλιακή και εντομοκτόνος¹⁷⁶. Χαρακτηριστική είναι η ισχυρή νεφροτοξική και καρκινογόνος δράση του, η οποία οδήγησε πολλούς Οργανισμούς, ανάμεσά τους και την Ευρωπαϊκή Επιτροπή (EC), στην απαγόρευση προϊόντων που περιέχουν αριστολοχικά οξέα²¹⁵. Παραδοσιακά σε διάφορα μέρη του κόσμου χρησιμοποιούνται είδη του γένους *Aristolochia* ως αντίδοτα σε δήγματα και νυγμούς δηλητηριωδών ζώων²⁰⁵. Η δράση αυτή φαίνεται ότι οφείλεται κατά κύριο λόγο στα αριστολοχικά οξέα που υπάρχουν σε αυτά τα είδη. Σύμφωνα με σχετικές μελέτες, το αριστολοχικό οξύ I είναι ένας μη συναγωνιστικός ανταγωνιστής της φωσφολιπάσης A₂²¹⁶, ενώ φαίνεται να είναι και ανταγωνιστής της υαλουρονιδάσης²¹⁷. Τα δύο αυτά ένζυμα αποτελούν συστατικά του δηλητηρίου των φιδιών^{156 155}.

Ο μεταβολίτης AH2 ταυτοποιήθηκε ως το αριστολοχικό οξύ II (MW=311.249 g/mol). Πραγματοποιήθηκαν πειράματα ¹H-NMR, COSY, HSQC-DEPT, HMBC σε διαλύτη (CD₃)₂SO και σύγκριση με τη βιβλιογραφία²¹².



Πίνακας 32. Φασματοσκοπικά δεδομένα του αριστολοχικού οξέος II ((CD₃)₂SO, 600 MHz)

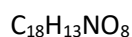
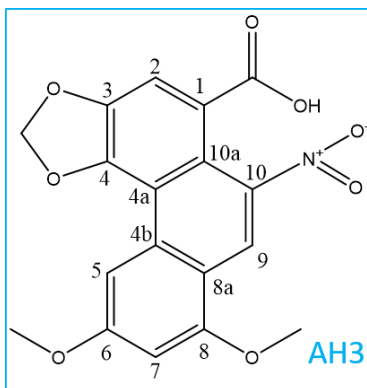
Θέση	¹ H-NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]	¹³ C-NMR (ppm)
1	-	124.51
2	7.82 (1H, s)	112.01
3	-	146.13
4	-	146.33

4a	-	117.02
4b	-	130.12
5	9.10 (1H, dd, $J = 8.2 / 1.3$ Hz)	126.78
6	7.92 (1H, td, $J = 8.2 / 1.3$ Hz)	130.95
7	7.82 (1H, td, $J = 8.2 / 1.3$ Hz)	128.96
8	8.26 (1H, dd, $J = 8.2 / 1.3$ Hz)	130.77
8a	-	128.80
9	8.60 (1H, s)	126.00
10	-	146.04
10a	-	117.35
C=O	-	167.91
3,4-OCH₂O	6.51 (2H, s)	103.22

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη 2 παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες με τον μεταβολίτη 1, ωστόσο στη συνέχεια περιγράφονται κάποια χαρακτηριστικά φασματοσκοπικά στοιχεία. Στην αρωματική περιοχή του φάσματος ¹H-NMR παρατηρούμε στα 9.10 ppm μια διπλή κορυφή ($J = 8.2$ Hz) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-5 (χαρακτηριστική αποθωράκιση), ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 126.78 ppm. Στις περιπτώσεις που δεν υπάρχει υποκατάσταση στις θέσεις 6, 7 και 8 του μορίου, το H-5 συντονίζεται πάνω από τα 9.00 ppm. Τα πρωτόνια των θέσεων 6 και 7 εμφανίζονται ως διπλές τριπλών κορυφές ($J = 7.8 / 1.3$ Hz) στα 7.92 ppm και 7.82 ppm, αντίστοιχα. Από τα φάσματα δύο διαστάσεων παρατηρείται πως οι άνθρακες αυτών των πρωτονίων συντονίζονται στα 130.95 ppm και 128.96 ppm, αντίστοιχα. Χαρακτηριστική στα φάσματα των αριστολοχικών οξέων είναι η απλή κορυφή του H-9 στα 8.60 ppm, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας του πρωτονίου συντονίζεται στα 126.00 ppm.

Το αριστολοχικό οξύ II, όπως και το αριστολοχικό οξύ I, έχει απομονωθεί από πλήθος ειδών του γένους *Aristolochia*, ενώ ενδεικτικά αναφέρονται μερικά είδη: *A. auricularia*, *A. cretica*, *A. heterophylla*, *A. manshuriensis* και *A. serpentaria*. Επίσης, έχει ανιχνευθεί σε είδη πεταλούδας, όπως το είδος *Baltus phileno*²¹⁴. Για το αριστολοχικό οξύ II έχουν πραγματοποιηθεί λιγότερες μελέτες σε σχέση με το αριστολοχικό οξύ I. Φαίνεται ότι διαθέτει αντιαμοπεταλιακή δράση¹⁷⁶, αλλά και τοξικότητα, καθώς σχηματίζει ομοιοπολικά σύμπλοκα με το DNA με τον ίδιο μηχανισμό όπως το αριστολοχικό οξύ I, εκδηλώνοντας μεταλλαξιογόνο και κυτταροτοξική δράση¹⁷⁸.

Ο μεταβολίτης **AH3** ταυτοποιήθηκε ως το αριστολοχικό οξύ IV (MW=371.301 g/mol). Πραγματοποιήθηκαν πειράματα $^1\text{H-NMR}$, COSY, HSQC-DEPT, HMBC σε διαλύτη $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ και σύγκριση με τη βιβλιογραφία²¹². Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη **AH3** παρουσιάζουν επίσης αρκετές ομοιότητες με τους μεταβολίτες **AH1** και **AH2**.



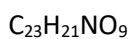
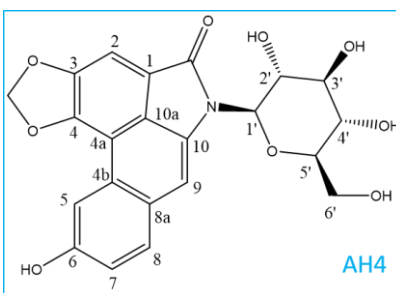
Πίνακας 33. Φασματοσκοπικά δεδομένα του αριστολοχικού οξέος IV (διαλύτης $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 600 MHz)

Θέση	$^1\text{H-NMR}$ [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]	$^{13}\text{C-NMR}$ (ppm)
1	-	124.51
2	7.79 (1H, s)	112.40
3	-	145.72
4	-	146.13
4a	-	116.95
4b	-	130.07
5	8.17 (1H, d, $J = 2.0$ Hz)	101.75
6	-	162.00
7	7.00 (1H, d, $J = 2.0$ Hz)	99.50
8	-	156.08
8a	-	113.85
9	8.58 (1H, s)	119.77
10	-	145.77
10a	-	116.98
C=O	-	168.07
3,4-OCH₂O	6.48 (2H, s)	103.25

6-OMe	3.98 (3H, s)	55.98
8-OMe	4.07 (3H, s)	56.45

Το αριστολοχικό οξύ IV έχει απομονωθεί από είδη του γένους *Aristolochia*, αλλά απαντάται σε μικρότερη συχνότητα από τα αριστολοχικά οξέα I και II. Ενδεικτικά αναφέρονται τα είδη *A. longa*, *A. mourinensis*, *Aristolochia argentina*, *A. cucurbitifolia* και *A. manshuriensis*²¹⁸²¹⁹²¹³. Ελάχιστες μελέτες έχουν γίνει για την βιολογική δράση του αριστολοχικού οξέος IV. Σύμφωνα με τους Pistelli *et. al.*²²⁰ το αριστολοχικό οξύ IV φαίνεται να έχει ασθενή άμεση μεταλαξιογόνο δράση.

Ο μεταβολίτης AH4 ταυτοποιήθηκε ως ο IIIA-N-β-D-γλυκοσίδη της αριστολακτάμης. Πρόκειται για έναν N-γλυκοσίδη της αριστολακτάμης IIIA με μοριακό βάρος 445.419 g/mol. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα ¹H-NMR, COSY, HSQC-DEPT, HMBC σε διαλύτη MeOD και σύγκριση με τη βιβλιογραφία²¹².



Πίνακας 34. Φασματοσκοπικά δεδομένα του N-β-D-γλυκοσίδη της αριστολακτάμης IIIA (MeOD, 600 MHz)

Θέση	¹ H-NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]	¹³ C-NMR (ppm)
1	-	124.62
2	7.57 (1H, s)	105.50
3	-	148.60
4	-	146.32
4a	-	111.44
4b	-	126.07
5	8.05 (1H, d, J = 2.5 Hz)	111.32

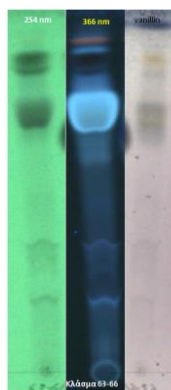
6	-	156.27
7	7.13 (1H, dd, $J = 8.5/2.5$ Hz)	117.57
8	7.79 (1H, d, $J = 8.5$ Hz)	131.07
8a	-	127.04
9	7.40 (1H, s)	108.24
10	-	131.34
10a	-	125.67
C=O	-	167.17
3,4-O-CH₂-O	6.39 (1H, s)	103.80
	6.41 (1H, s)	
1'	5.56 (1H, d, $J = 9.3$ Hz)	82.50
2'	4.11 (1H, m)	70.84
3'	3.50-3.70 (1H, m)	70.84
4'	3.50-3.70 (1H, m)	78.17
5'	3.50-3.70 (1H, m)	80.77
6'a	3.95 (1H, dd, $J = 12.5/2.5$ Hz)	61.82
6'b	3.83 (1H, dd, $J = 12.5/5.2$ Hz)	61.84

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του μεταβολίτη παρατηρείται σύστημα 1,2,4-τρις υποκατάστασης, το οποίο αποτελείται από μια διπλή κορυφή στα 8.05 ppm ($J = 2.5$ Hz, σύζευξη meta), που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 5, μια διπλή κορυφή στα 7.79 ppm με σταθερά σύζευξης $J = 8.5$ Hz (σύζευξη ortho) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 8 και μια διπλή διπλών κορυφή στα 7.13 ppm με σταθερές σύζευξης $J = 8.5$ και 2.5 Hz που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 7. Τα πρωτόνια των θέσεων 2 και 9 εμφανίζονται ως απλές κορυφές στα 7.57 ppm και 7.40 ppm, αντίστοιχα. Τα πρωτόνια της μεθυλενοδιόξυ- υποκατάστασης εμφανίζονται ως δυο απλές κορυφές στα 6.39 και 6.41 ppm. Το πρωτόνιο του ανωμερικού άνθρακα της γλυκόζης εντοπίζεται στα 5.56 ppm, ως μια διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης $J = 9.3$ Hz, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 82.50 ppm.

Ο N-β-D-γλυκοσίδης της αριστολακτάμης IIIA, ο οποίος στη βιβλιογραφία αναφέρεται και ως N-β-D-γλυκοσίδης της αριστολακτάμης C, έχει απομονωθεί στο παρελθόν από είδη του

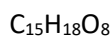
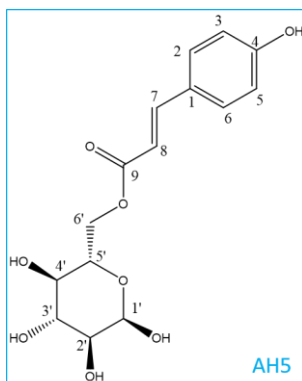
γένους *Aristolochia*, ενώ ενδεικτικά αναφέρονται κάποια είδη: *A. elegans*²²¹, *A. kankauensis*²²², *A. indica*, *A. cinnabarina* και *A. rotunda*²²³. Ο N-β-D-γλυκοσίδης της αριστολακτάμης IIIA έχει δείξει κυτταροτοξική δράση στις καρκινικές σειρές P-388 (λευχαιμικά κύτταρα ποντικού), A-549 (ανθρώπινα κύτταρα πνευμονικού αδενοκαρκινώματος), HT-29 (κύτταρα αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου) και HL-60 (ανθρώπινα λευχαιμικά κύτταρα). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η χαμηλή τοξικότητα της στην φυσιολογική κυτταρική σειρά επιθηλιακών νεφρικών κυττάρων χοίρου, LLC-PK1²²⁴.

Η ουσία **AH4** παραλήφθηκε από το κλάσμα AHRC 63-66 (22 mg) σε καθαρότερη μορφή με διάλυση σε ακετόνη και φυγοκέντρηση του προκύπτοντος εναιωρήματος για 10 min στις 3500 rpm, ώστε να συλλεχθεί το ίζημα. Το ίζημα διαλύθηκε σε δευτεριωμένη MeOH και έγινε φασματοσκοπική μελέτη.



Εικόνα 97. Χρωματογράφημα του κλάσματος 63-66 σε σύστημα ανάπτυξης DCM/MeOH/H₂O 70/30/4

Ο μεταβολίτης **AH5** ταυτοποιήθηκε ως η 6-O-π-κουμαροϋλο-α-D-γλυκοκυρανόση. Πρόκειται γλυκοζυλιωμένο κουμαρικό παράγωγο με μοριακό βάρος 326.301 g/mol. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα ¹H-NMR, COSY, HSQC-DEPT, HMBC σε διαλύτη MeOD και σύγκριση με τη βιβλιογραφία²²⁵.



Πίνακας 35. Φασματοσκοπικά δεδομένα της 6-Ο-π-κουμαρούλο-α-D-γλυκοκυρανόσης (MeOD, 600 MHz)

Θέση	$^1\text{H-NMR}$ [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]	$^{13}\text{C-NMR}$ (ppm)
1	-	127.30
2/6	7.47 (2H, d, $J = 8.2$ Hz)	130.02
3/5	6.83 (2H, d, $J = 8.2$ Hz)	115.54
4	-	161.34
7	7.65 (1H, d, $J = 16.0$ Hz)	145.77
8	6.36 (1H, d, $J = 16.0$ Hz)	113.82
9	-	168.87
1'	5.13 (1H, d, $J = 3.5$ Hz)	92.94
2'	3.18-4.51*	72.75
3'	3.18-4.51*	75.61
4'	3.18-4.51*	72.15
5'	3.18-4.51*	70.90
6'a	4.47 (1H, dd, $J = 12.0/2.0$ Hz)	63.52
6'b	4.33 (1H, dd, $J = 12.0/6.0$ Hz)	63.54

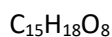
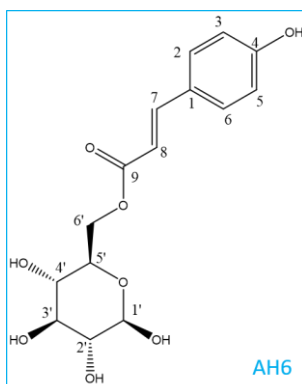
*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη σημάτων

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ παρατηρούνται δύο διπλές κορυφές στα 7.65 ppm ($J = 16.0$ Hz) και 6.36 ppm ($J = 16.0$ Hz) που αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-7 και H-8 του *trans* διπλού δεσμού της ένωσης, αντίστοιχα. Οι άνθρακες των πρωτονίων αυτών εντοπίζονται στα 145.77 ppm και 113.82 ppm, αντίστοιχα. Τα πρωτόνια των θέσεων 2,6 και 3,5 του αρωματικού δακτυλίου στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ εμφανίζονται ως δύο διπλές κορυφές στα 7.47 ppm ($J = 8.2$ Hz) και 6.83 ppm ($J = 8.2$ Hz),

αντίστοιχα. Η διπλή κορυφή στα 5.13 ppm ($J = 3.5$ Hz) και ο άνθρακας στα 92.94 ppm αντιστοιχούν στο ανωμερικό μεθίλιο της α -γλυκόζης. Οι δύο διπλές διπλών κορυφές στα 4.33 ppm ($J = 12.0 / 6.0$ Hz) και 4.47 ppm ($J = 12.0 / 2.0$ Hz) αντιστοιχούν στα πρωτόνια του μεθυλενίου της θέσεως 6 της γλυκόζης. Από το φάσμα HMBC διαπιστώνουμε την θέση σύνδεσης του κουμαρικού τμήματος με το σάκχαρο, αφού παρατηρούμε σύζευξη 3J των πρωτονίων της θέσης 6 της γλυκόζης (4.33 ppm και 4.47 ppm) με τον άνθρακα του καρβονυλίου, ο οποίος συντονίζεται στα 168.87 ppm.

Η 6-*O*-π-κουμαροϋλο- α -D-γλυκοκυρανόση και η 6-*O*-π-κουμαροϋλο- β -D-γλυκοκυρανόση απομονώθηκαν πρώτη φορά από το φλοιό του είδους *Prunus buergeriana*²²⁶. Έχουν απομονωθεί από τις ρίζες του είδους *Aristolochia cretica*. Το β -ισομερές έχει παραληφθεί από τα φύλλα του είδους *Camellia pachyandra* και έχει επιδείξει ικανότητα εξουδετέρωσης της ελεύθερης ρίζας DPPH και μέτρια αναστολή της τυροσινάσης. Έχει παραληφθεί ακόμη από τα άνθη του *Spirea salicifolia* (Rosaceae).

Ο μεταβολίτης AH6 ταυτοποιήθηκε ως η 6-*O*-π-κουμαροϋλο- β -D-γλυκοκυρανόση. Πρόκειται γλυκοζυλιωμένο κουμαρικό παράγωγο με μοριακό βάρος 326.301 g/mol. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα $^1\text{H-NMR}$, COSY, HSQC-DEPT, HMBC σε διαλύτη MeOD και σύγκριση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα²²⁵.



Πίνακας 36. Φασματοσκοπικά δεδομένα της 6-Ο-π-κουμαροϋλο-β-D-γλυκοκυρανόσης (MeOD, 600 MHz)

Θέση	¹ H-NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]	¹³ C-NMR (ppm)
1	-	127.30
2/6	7.47 (2H, d, $J = 8.2$ Hz)	130.02
3/5	6.83 (2H, d, $J = 8.2$ Hz)	115.54
4	-	161.34
7	7.65 (1H, d, $J = 16.0$ Hz)	145.77
8	6.36 (1H, d, $J = 16.0$ Hz)	113.82
9	-	168.87
1'	4.53 (1H, d, $J = 7.8$ Hz)	97.16
2'	3.18-4.51*	74.79
3'	3.18-4.51*	77.22
4'	3.18-4.51*	71.99
5'	3.18-4.51*	74.90
6'a	4.47 (1H, dd, $J = 12.0/2.0$ Hz)	63.55
6'b	4.33 (1H, dd, $J = 12.0/6.0$ Hz)	63.59

*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη σημάτων

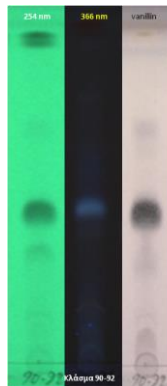
Το φάσμα ¹H-NMR του μεταβολίτη **AH6** διαφέρει από αυτό του μεταβολίτη **AH5** μόνο στο ανωμερικό πρωτόνιο της β-γλυκόζης, το οποίο συντονίζεται στα 4.53 ppm και εμφανίζεται ως διπλή κορυφή με $J = 7.8$ Hz. Ο αντίστοιχος άνθρακας του πρωτονίου αυτού συντονίζεται στα 97.16 ppm (HSQC-DEPT).

Μετά από κατεργασία των FCPC κλασμάτων παραλήφθηκε η παρακάτω ουσία:

Ακρετοσίδης (6-Ο-π-κουμαροϋλο-β-D-φρουκτοφουρανοσυλο-(2→1)-α-D-γλυκοκυρανοσίδης)
(Κλάσμα AHRC 90-92) (**AH7**)

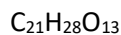
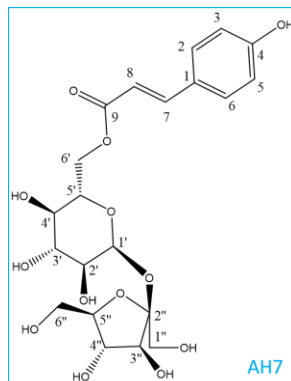
Η απομόνωση της ουσίας **AH7** έγινε με την μέθοδο της ανακρυστάλλωσης. Τα 123.2 mg του κλάσματος AHRC 90-92 τοποθετήθηκαν σε falcon, διαλύθηκαν σε ακετόνη και στη συνέχεια αφέθηκαν σε ηρεμία ώστε να καθιζάνει το ίζημα. Έπειτα το falcon φυγοκεντρήθηκε για 15 min στις 3500 rpm με τη βοήθεια της συσκευής Heraeus Multifuge 3S ώστε να συλλεχθεί το ίζημα. Στο ίζημα προστέθηκε μεθανόλη χωρίς όμως να το διαλύσει πλήρως. Το διάλυμα

επαναφυγοκεντρήθηκε όπως παραπάνω και το ίζημα διαλύθηκε εκ νέου σε διάλυμα μεθανόλης:νερού 80:20. Η ανάλυση με TLC του μεθανολικού και του υδατομεθανολικού διαλύματος ανέδειξε την ύπαρξη της ουσίας στόχου αλλά με υψηλότερη καθαρότητα στο υδατομεθανολικό διάλυμα, στο οποίο έγινε και φασματοσκοπική μελέτη. Η φασματοσκοπική μελέτη που ακολούθησε φανέρωσε την ύπαρξη του ακρετοσίδης, ενός γλυκοσίδης που έχει απομονωθεί στο παρελθόν από την *Aristolochia cretica*, ενδημικό φυτό της Ελλάδας²¹⁴.



Εικόνα 98. Χρωματογράφημα του κλάσματος 90-92 σε σύστημα ανάπτυξης DCM/MeOH/H₂O 70/30/4

Ο μεταβολίτης **AH7** ταυτοποιήθηκε ως ο ακρετοσίδης. Πρόκειται για έναν εστέρα σουκρόζης ο οποίος αποτελεί χαρακτηριστικό μεταβολίτη του γένους, με μοριακό βάρος 488.44 g/mol. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα ¹H-NMR, COSY, HSQC-DEPT, HMBC σε διαλύτη MeOD και σύγκριση με τη βιβλιογραφία²¹⁴.



Πίνακας 37. Φασματοσκοπικά δεδομένα του ακρετοσίδη (MeOD, 600 MHz)

Θέση	¹ H-NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]	¹³ C-NMR (ppm)
1	-	126.40
2/6	7.50 (2H, d, $J = 8.5$ Hz)	130.82
3/5	6.83 (2H, d, $J = 8.5$ Hz)	116.37
4	-	160.87
7	7.65 (1H, d, $J = 15.9$ Hz)	145.22
8	6.42 (1H, d, $J = 15.9$ Hz)	114.51
9	-	167.67
Glc-1'	5.43 (1H, d, $J = 3.9$ Hz)	92.47
2'	3.49 (1H, dd, $J = 3.7/9.8$ Hz)	73.04
3'	3.75 (1H, dd, $J = 9.0/10.0$ Hz)	73.57
4'	3.33 (1H, dd, $J = 9.0/10.0$ Hz)	71.04
5'	4.11 (1H, m)	70.71
6'a	4.52 (1H, dd, $J = 12.2/1.9$ Hz)	64.00
6'b	4.31 (1H, dd, $J = 12.2/5.6$ Hz)	
Fru-1''a	3.68 (1H, d, $J = 12.4$ Hz)	63.02
Fru-1''b	3.72 (1H, d, $J = 12.4$ Hz)	
2''	-	104.40
3''	4.09 (1H, d, $J = 8.8$ Hz)	78.21
4''	4.06 (1H, t, $J = 8.8$ Hz)	75.07
5''	3.80 (1H, m) *	82.95
6''a	3.78 (1H, m) *	62.12
6''b	3.82 (1H, m) *	

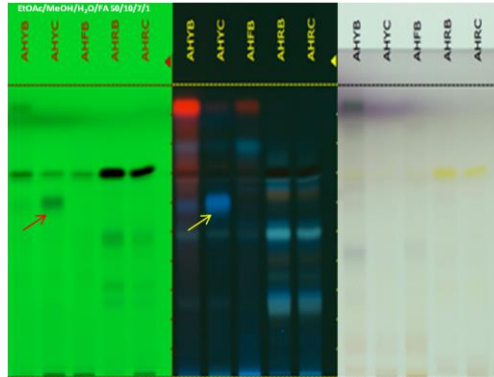
* Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη σημάτων

Το φάσμα ¹H-NMR του μεταβολίτη **AH7** μοιάζει αρκετά με αυτό του μεταβολίτη **AH5**. Χαρακτηριστικά φασματοσκοπικά δεδομένα του ακρετοσίδη αποτελούν οι διπλές κορυφές στα 7.65 ppm ($J = 15.9$ Hz) και στα 6.42 ppm ($J = 15.9$ Hz) που αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-7 και H-8 του *trans* διπλού δεσμού του μορίου, αντίστοιχα. Πρόκειται για χαρακτηριστικές κορυφές σε φάσμα ¹H-NMR που υποδηλώνουν την ύπαρξη παραγώγου κινναμωμικού οξέος. Τα αντίστοιχα σήματα άνθρακα των πρωτονίων αυτών εμφανίζονται στα 145.22 ppm (C-7) και 114.51 ppm (C-

8) (HSQC-DEPT). Η διπλή κορυφή στα 7.50 ppm ($J = 8.5$ Hz) που ολοκληρώνει για δυο πρωτόνια στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ αντιστοιχεί στα πρωτόνια των θέσεων 2 και 6 του μορίου. Τα πρωτόνια των θέσεων 3 και 5 του μορίου εμφανίζονται ως διπλή κορυφή στα 6.83 ppm ($J = 8.5$ Hz). Οι αντίστοιχοι άνθρακες των πρωτονίων συντονίζονται στα 130.82 ppm (C-2,C-6) και 116.37 ppm (C-3,C-5). Το ανωμερικό πρωτόνιο της γλυκόζης εμφανίζεται ως μια διπλή κορυφή στα 5.43 ppm ($J = 3.9$ Hz) στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας στα 92.47 ppm (φάσμα HSQC-DEPT). Οι δύο διπλές διπλών κορυφές στα 4.52 ppm ($J = 12.2/1.9$ Hz) και 4.31 ppm ($J = 12.2/5.6$ Hz) αντιστοιχούν στα πρωτόνια του μεθυλενίου της θέσης 6 της γλυκόζης, των οποίων ο άνθρακας συντονίζεται στα 64.00 ppm. Στο φάσμα πρωτονίου η διπλή διπλών κορυφή στα 3.49 ppm ($J = 9.8/3.7$ Hz) αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 2 του μορίου της γλυκόζης, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 73.04 ppm. Δύο διπλές κορυφές στα 3.72 και 3.68 ppm ($J = 12.4$ Hz) στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ αντιστοιχούν στα 2 πρωτόνια του μεθυλενίου της θέσης 1 της φρουκτόζης. Τα σήματα των υπόλοιπων πρωτονίων της φρουκτόζης και της γλυκόζης εμφανίζονται στην περιοχή από 4.10 ppm έως και 3.75 ppm. Από το φάσμα HMBC διαπιστώθηκε η θέση σύνδεσης του κουμαρικού τμήματος με το δισακχαρίτη, αφού φαίνεται η σύζευξη 3J των πρωτονίων της θέσης 6 της γλυκόζης (4.52 ppm και 4.31 ppm) με τον άνθρακα του καρβονυλίου στα 167.67 ppm. Από το ίδιο φάσμα διαπιστώνεται και ο τρόπος σύνδεσης των σακχάρων μεταξύ τους, αφού παρατηρείται σύζευξη 4J του ανωμερικού πρωτονίου της γλυκόζης (5.43 ppm) με τον ανωμερικό άνθρακα της φρουκτόζης (θέση 2) στα 104.40 ppm, ο οποίος είναι τεταρτοταγής. Στο φάσμα HSQC-DEPT οι τρεις μεθυλενικοί άνθρακες στα 63.02, 62.12 και 64.00 ppm αντιστοιχούν στους τρεις μεθυλενικούς άνθρακες της θέσης 1 της φρουκτόζης και της θέσης 6 των μορίων της φρουκτόζης και γλυκόζης, αντίστοιχα.

Ο ακρετοσίδης απομονώθηκε πρώτη φορά από το μεθανολικό εκχύλισμα των ριζών της *Aristolochia cretica*, ένα ενδημικό είδος της Κρήτης²¹⁴. Έχει ανιχνευθεί ξανά στις ρίζες του είδους *Scrophularia ningproensis*²²⁷ και στους καρπούς του είδους *Kigelia pinnata*²²⁸. Ο ακρετοσίδης έχει επιδείξει αντιλεϊσμμανική δράση έναντι του προμαστιγωτών του είδους *L. donovani*²²⁵.

- ❖ Υδατομεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του είδους *Aristolochia hirta* (Κωδικός εκχυλίσματος: AHYC):

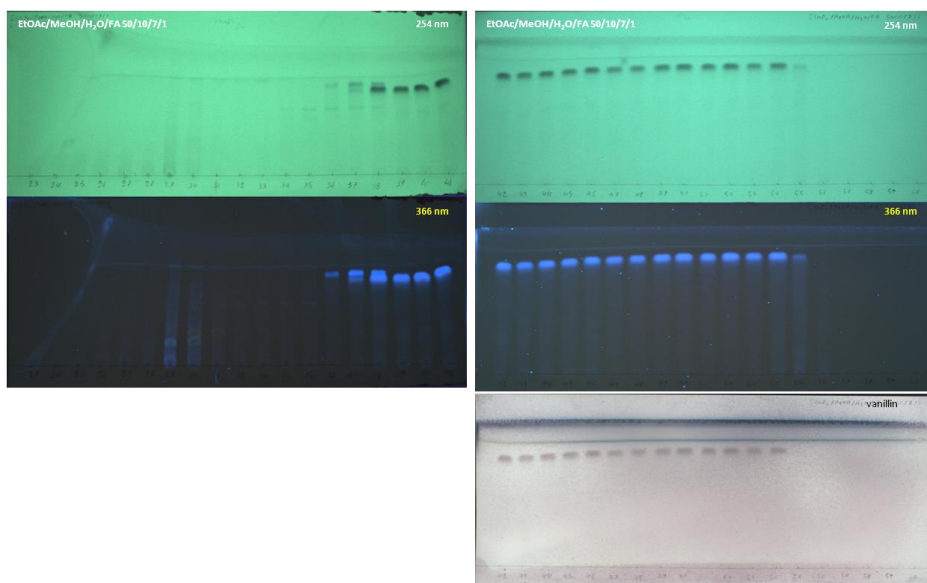


Εικόνα 99. Χρωματογραφήματα HPTLC των πολικών εκχυλισμάτων του είδους *Aristolochia hirta* σε σύστημα ανάπτυξης EtOAc/MeOH/H₂O/FA 50/10/7/1, AHYB: μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του είδους *Aristolochia hirta*, AHYC: υδατομεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του είδους *Aristolochia hirta*, AHFB: μεθανολικό εκχύλισμα των ανθέων του είδους *Aristolochia hirta*, AHRB: μεθανολικό εκχύλισμα των ριζών του είδους *Aristolochia hirta*, AHRC: υδατομεθανολικό εκχύλισμα των ριζών του είδους *Aristolochia hirta*

Το μοναδικό εκχύλισμα της αριστολόχιας το οποίο είχε δράση, και μάλιστα ισχυρή, στη δοκιμασία αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης ήταν το υδατομεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του είδους (AHYC). Στη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας που έγινε με σκοπό τη σύγκριση του χημικού φορτίου των πολικών εκχυλισμάτων του είδους, φάνηκε ότι το εκχύλισμα AHYC περιέχει μια ουσία (επισημαίνεται στην παραπάνω εικόνα) που δεν παρατηρείται στα υπόλοιπα εκχυλίσματα. Έτσι λοιπόν έγινε η υπόθεση ότι η διαφορά στη δράση οφείλεται στην ουσία αυτή και πραγματοποιήθηκε η απομόνωση της απευθείας από το ολικό εκχύλισμα AHYC, προτού γίνει η κλασμάτωσή του.

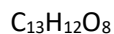
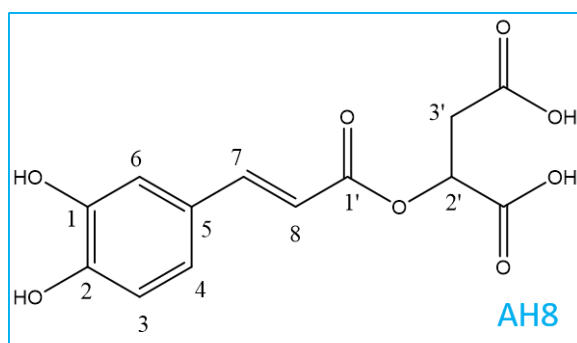
Πιο συγκεκριμένα, ζυγίστηκαν 2.042g υδατομεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων της *A. hirta*, τα οποία διαλύθηκαν σε 100 mL νερό και υπέστησαν υγρή-υγρή εκχύλιση με 100 mL βουτανόλης, συνολικά σε 3 κύκλους. Η υδατική φάση, έπειτα από τους 3 κύκλους, είχε μορφή γαλακτώματος και έτσι προστέθηκαν άλλα 40 mL βουτανόλης στη διαχωριστική χοάνη και αφέθηκαν σε ηρεμία για 1,5 ώρα μέχρι τον πλήρη διαχωρισμό. Η υδατική φάση εξατμίστηκε σε αντλία κενού. Στο ξηρό υπόλειμμα προστεθήκαν 22 mL μεθανόλης και το εναιώρημα τοποθετήθηκε εναλλάξ σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 50 °C και σε λουτρό υπερήχων με σκοπό τη διάλυση του περιεχόμενου ιζήματος. Το εναιώρημα μεταφέρθηκε σε falcon και τοποθετήθηκε σε ψυγείο για 30 λεπτά. Στη συνέχεια το falcon φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 3500 rpm. Το υπερκείμενο συμπυκνώθηκε και τα συστατικά του διαχωρίστηκαν με χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού (sephadex) με κινητή φάση μεθανόλη:νερό

50:50. Τα κλάσματα που προέκυψαν ελέγχθηκαν με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) και σύστημα ανάπτυξης EtOAc/MeOH/H₂O/FA 50/10/7/1.



Εικόνα 100. Χρωματογραφήματα TLC των κλασμάτων 23- 60 που παραλήφθηκαν από τη στήλη sephadex του κατεργασμένου εκχυλίσματος ΑΗΥC. Σύστημα ανάπτυξης EtOAc/MeOH/H₂O/FA 50/10/7/1

Ο μεταβολίτης **AH8** απομονώθηκε από το κατεργασμένο υδατομεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων της *A.hirta* (κλάσμα ΑΗΥC 39-54) και ταυτοποιήθηκε ως το καφεοϋλομαλικό οξύ (MW=296.233 g/mol) με τη λήψη φασμάτων ¹H-NMR, COSY, HSQC-DEPT, HMBC σε διαλύτη MeOD και σύγκριση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα²²⁹.



Πίνακας 38. Φασματοσκοπικά δεδομένα του καφεοϋλομαλικού οξέος (MeOD, 600 MHz)

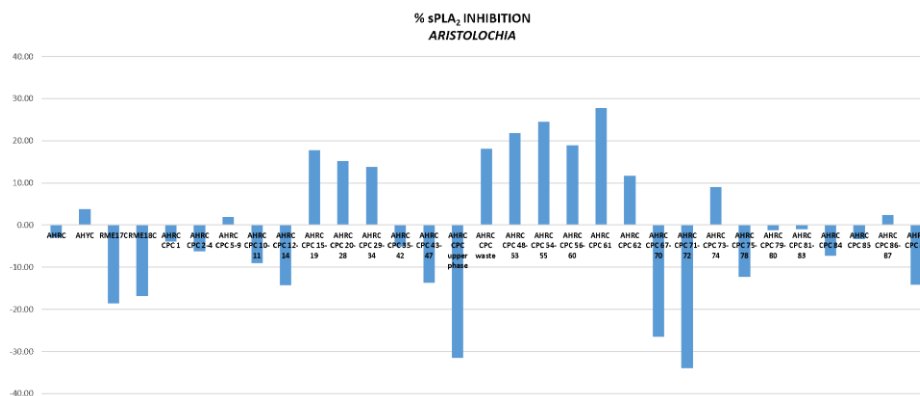
Θέση	¹ H-NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]	¹³ C-NMR (ppm)
1	-	146.40
2	-	149.38
3	6.78 (1H, d, $J = 8.2$ Hz)	116.55
4	6.97 (1H, dd, $J = 8.2/2.0$ Hz)	122.78
5	-	127.66
6	7.07 (1H, d, $J = 2.0$ Hz)	114.76
7	7.58 (1H, d, $J = 15.9$ Hz)	146.60
8	6.35 (1H, d, $J = 15.9$ Hz)	115.19
1'	-	168.36
2'	5.40 (1H, dd, $J = 9.0/3.8$ Hz)	72.10
3'a	2.96 (1H, dd, $J = 16.2/3.8$ Hz)	38.36
3'b	2.79 (1H, dd, $J = 16.2/9.0$ Hz)	
C=O	-	173.42

Στο φάσμα ¹H-NMR του μεταβολίτη **AH8** παρατηρούνται τα εξής: ένα 1,3,4-τρισ-υποκατεστημένο αρωματικό σύστημα με το πρωτόνιο της θέσης 6 να εμφανίζεται στα 7.07 ppm, ως μια διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης $J = 2.0$ Hz (meta σύζευξη), το πρωτόνιο της θέσης 4 να εντοπίζεται στα 6.97 ppm ως μια διπλή διπλών κορυφή με σταθερές σύζευξης $J = 8.2$ και 2.0 Hz, ενώ το πρωτόνιο της θέσης 3 εμφανίζεται στα 6.78 ppm ως μια διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης $J = 8.2$ Hz (ortho σύζευξη). Επίσης παρατηρούνται τα σήματα ενός *trans* διπλού δεσμού. Πιο συγκεκριμένα τα πρωτόνια 7 και 8 εντοπίζονται στα 7.58 ppm και 6.35 ppm αντίστοιχα ως διπλές κορυφές με σταθερά σύζευξης $J = 15.9$ Hz, ενώ οι αντίστοιχοι άνθρακες συντονίζονται στα 146.60 ppm και 115.19 ppm. Στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος και συγκεκριμένα στα 5.40 ppm παρατηρείται χαρακτηριστική διπλή διπλών κορυφή με σταθερές σύζευξης $J = 9.0/3.8$ Hz και άνθρακα (HSQC-DEPT) που συντονίζεται στα 72.10 ppm, η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 2' του καφεοϋλομαλικού οξέος. Στην αλειφατική περιοχή του φάσματος είναι εμφανείς δύο διπλές διπλών κορυφές με χημικές μετατοπίσεις 2.96 ppm και 2.79 ppm με σταθερές σύζευξης $J = 16.2/3.8$ Hz και $J = 16.2/9.0$ Hz, αντίστοιχα. Οι κορυφές αυτές αντιστοιχούν στα πρωτόνια του μεθυλενίου της θέσης 1'. Στο φάσμα HMBC παρατηρούνται δύο σήματα στα 173.42 ppm και 168.36 ppm, τα οποία αντιστοιχούν στα καρβονύλια του μεταβολίτη.

Είναι η πρώτη φορά που απομονώνεται το καφεοϋλομαλικό οξύ από την οικογένεια Aristolochiaceae. Το *trans*-καφεοϋλο-μαλικό οξύ, όπου στη βιβλιογραφία αναφέρεται και ως φασελικό οξύ, είναι ένας κοινός φυτικός μεταβολίτης ο οποίος εντοπίζεται σε μια μεγάλη ποικιλία ειδών: *Trifolium subterraneum*, *Raphanus sativus*, *Marrubium velutinum*, *Juggermannia subulata*, *Lactuca sativa* var. *capitata* και *Brassica rapa* (φύλλα)²³⁰. Μελέτες έχουν δείξει ότι το καφεοϋλομαλικό οξύ έχει αντιοξειδωτική²³¹ ²³², κυτταροπροστατευτική και αντιμυτωτική δράση έναντι της καρκινικής σειράς γλοιοβλαστώματος U87-MG²³³.

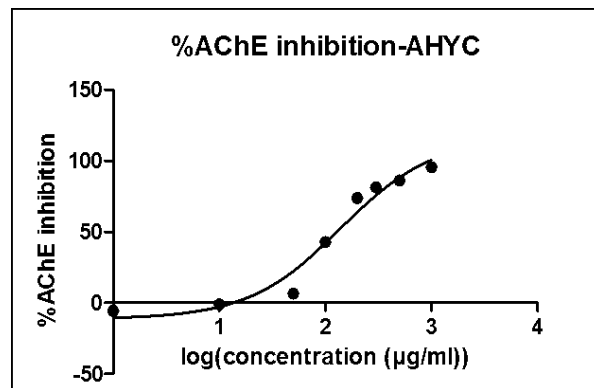
10.3.6 Βιολογική αξιολόγηση AHRC και AHYC εκχυλισμάτων, FCPC κλασμάτων και ουσιών

Στο ένζυμο της εκκριτικής φωσφολιπάσης A₂ (sPLA₂) αξιολογήθηκαν μόνο τα κλάσματα που προέκυψαν από τη φυγόκεντρο χρωματογραφία κατανομής του υδατομεθανολικού εκχυλίσματος των ριζών του είδους *Aristolochia hirta*. Οι λόγοι που η δοκιμασία πραγματοποιήθηκε σε αυτά τα συγκεκριμένα δείγματα είναι το υψηλό κόστος του πειράματος και η ύπαρξη πληθώρας βιβλιογραφικών μελετών που αναφέρουν τη δράση του αριστολοχικού οξέος επί του ενζύμου. Ο έλεγχος δεν ανέδειξε κάποιον ισχυρό αναστολέα σε αντίθεση με τη βιβλιογραφία. Το γεγονός αποδόθηκε στην φύση του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε (sPLA₂ από δηλητήριο μέλισσας). Υπάρχουν αναφορές που σχετίζουν την ύπαρξη ή όχι ανασταλτικής δράσης του αριστολοχικού οξέος ανάλογα με την προέλευση της φωσφολιπάσης που χρησιμοποιείται σε μια βιοδοκιμή. Ακολούθως παρατίθενται τα αποτελέσματα της δοκιμασίας αναστολής της φωσφολιπάσης από εκχυλίσματα και κλάσματα της *A. hirta*.

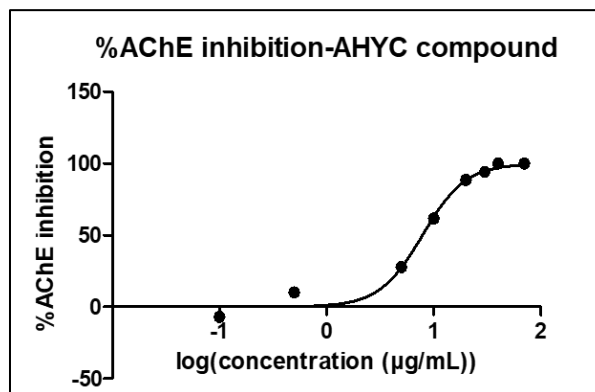


Εικόνα 101. % αναστολή της sPLA₂ που προκάλεσαν τα AHRC FCPC κλάσματα

Για το υδατομεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του είδους *Aristolochia hirta* (AHYC), το οποίο είχε επιδείξει αξιοσημείωτη δράση κατά τον αρχικό έλεγχο, υπολογίστηκε η συγκέντρωση που επιτυγχάνεται το 50% της αναστολής της δραστηριότητας της ακετυλοχολινεστεράσης (IC_{50}) στα 138.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Αξιολογήθηκε επίσης η ικανότητα αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης από το καφεοϋλομαλικό οξύ, ουσία που απομονώθηκε από το παραπάνω εκχύλισμα και το διαφοροποιεί από τα υπόλοιπα εκχυλίσματα του είδους. Η βιοδοκιμή αυτή ανέδειξε το καφεοϋλο-μαλικό οξύ ως έναν ισχυρό αναστολέα του ενζύμου με τιμή IC_{50} στα 7.87 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Μέθοδος NA-FBB).



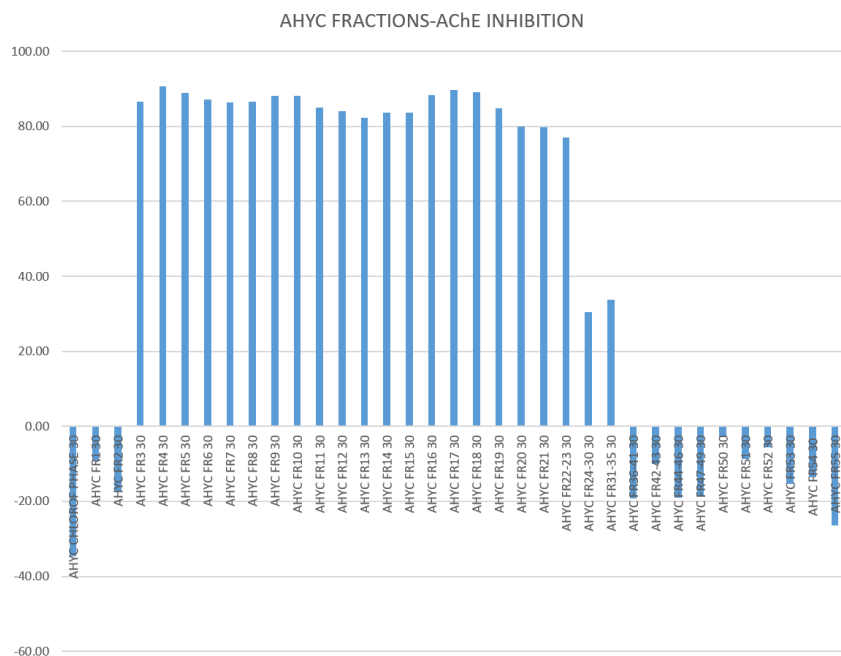
Εικόνα 102. Καμπύλη % AChE αναστολής-συγκέντρωσης για το εκχύλισμα AHYC



Εικόνα 103. Καμπύλη % AChE αναστολής-συγκέντρωσης για το καφεοϋλομαλικό οξύ

Μετά την ανάδειξη του καφεοϋλομαλικού οξέος ως δραστικό AChE αναστολέα, πραγματοποιήθηκε η κλασμάτωση του εκχυλίσματος AHYC με την τεχνική FCPC προκειμένου η δραστική ουσία να παραληφθεί σε μεγαλύτερη ποσότητα αλλά και για να εξεταστεί αν τυχόν υπάρχουν και άλλα δραστικά παράγωγα στο εκχύλισμα. Τα κλάσματα που παραλήφθηκαν μετά την κλασμάτωση του εκχυλίσματος, με τη διαδικασία που περιγράφηκε στην αντίστοιχη ενότητα, αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητα αναστολής της AChE (Μέθοδος NA-FBB) στα 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και

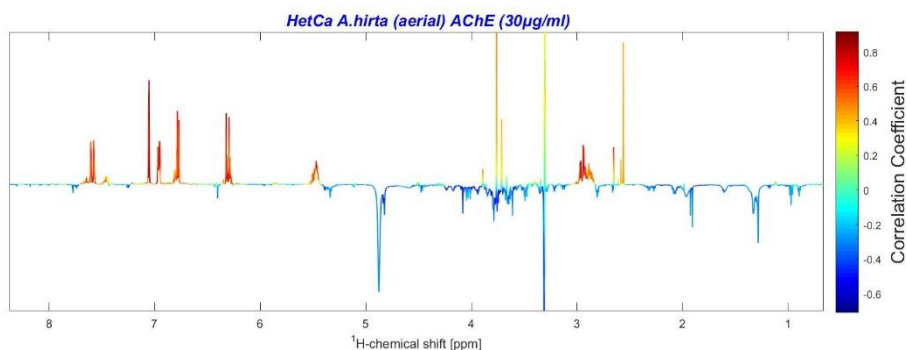
τα αποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω ραβδόγραμμα όπου παρατηρείται ισχυρή αναστολή (76.95-90.62%) σε όλα τα κλάσματα από το AHYC FR3 έως το AHYC FR22-23 (AHYC_23).



Εικόνα 104. Ραβδόγραμμα % AChE αναστολής των FCPC κλασμάτων του εκχυλίσματος AHYC στα 30 µg/mL.

10.3.7 Μελέτη ετεροδιακύμανσης φασματοσκοπικών δεδομένων και βιοδραστικότητας (HetCA) στο εκχύλισμα AHYC

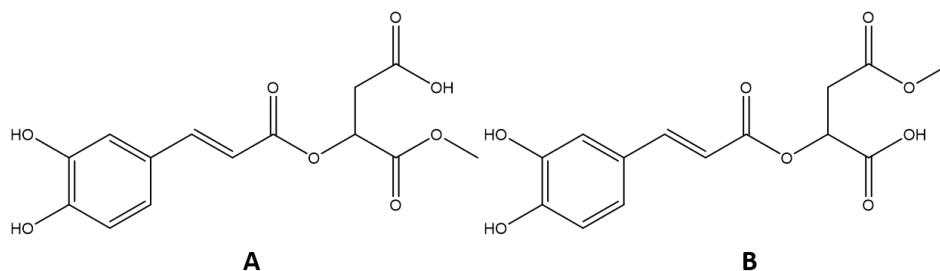
Η συσχέτιση των 1D φασματοσκοπικών δεδομένων $^1\text{H-NMR}$ και της ικανότητας αναστολής της AChE των AHYC κλασμάτων του CPC εξετάστηκε μέσω του ανεπτυγμένου στατιστικού μοντέλου HetCA. Πιο συγκεκριμένα, λαμβάνει χώρα η συσχέτιση των συντονισμών των συνολικών δεδομένων NMR με τις αντίστοιχες τιμές βιοδραστικότητας, παρέχοντας τη δυνατότητα ταυτοποίησης της δομής των υπεύθυνων για τη δράση φυσικών προϊόντων. Από το συνολικό 1D ψευδοφάσμα $^1\text{H-NMR}$ του εκχυλίσματος AHYC, το οποίο παρουσιάζεται στην Εικόνα 105, γίνεται αντιληπτή η συσχέτιση της δραστηριότητας με παράγωγα καφεοϋλομαλικού οξέος (κορυφές ψευδοφάσματος σε κόκκινες αποχρώσεις). Σε αυτό παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές κορυφές στην αρωματική περιοχή του φάσματος και συγκεκριμένα εντοπίζονται στα 7.58 ppm και 6.35 ppm οι κορυφές του *trans* διπλού δεσμού, στα 7.07 ppm, 6.97 ppm και 6.78 ppm οι κορυφές του ABX συστήματος, στα 5.40 ppm η κορυφή του οξυγονωμένου πρωτονίου και στα 2.96 ppm και 2.79 ppm οι κορυφές των δύο αλειφατικών πρωτονίων.



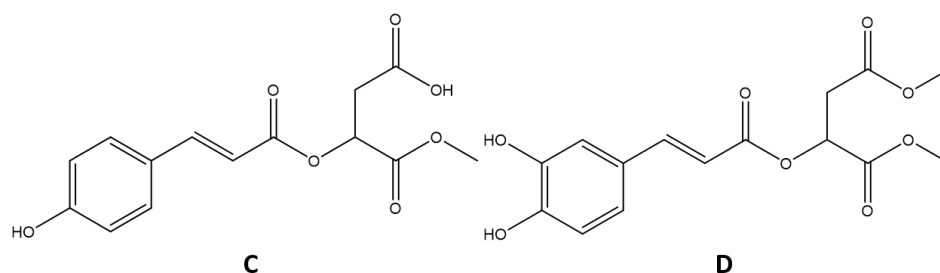
Εικόνα 105. 1D ψευδοφάσμα $^1\text{H-NMR}$ ετεροδιακύμανσης AChE αναστολής και αντίστοιχων NMR δεδομένων που προκύπτουν μέσω του αλγορίθμου HetCA των FCPC κλασμάτων του υδατομεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων της *Aristolochia hirta* (AHYC)

Ακολούθως, η συσχέτιση των 1D φασματοσκοπικών δεδομένων $^1\text{H-NMR}$ και της βιολογικής δράσης των κλασμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω μιας αυτοματοποιημένης διαδικασίας όπου ο αλγόριθμος HetCA εφαρμοζόταν χρησιμοποιώντας επαναληπτικά κάθε φορά 4 φάσματα με βήμα 1 οδηγώντας έτσι στη δημιουργία 32 ψευδοφασμάτων. Σε κάθε επανάληψη υπολογιζόταν η συσχέτιση των δεδομένων NMR 4 κλασμάτων και των αντίστοιχων τιμών της δραστηριότητας, ώστε να γίνει δυνατή η δομική ταυτοποίηση των χαρακτηριστικών των βιοδραστικών συστατικών.

Μέσω των 32 1D ψευδοφασμάτων $^1\text{H-NMR}$ που προέκυψαν από τα 35 FCPC κλάσματα του υδατομεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων της *A. hirta* (AHYC), μετά από συσχέτισεις 1D φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ και ανασταλτικών δράσεων επί της AChE με εφαρμογή του αλγορίθμου HetCA, έγινε δυνατή η ταυτοποίηση των συστατικών τα οποία συνεισφέρουν περισσότερο στη δράση του ολικού εκχυλίσματος. Αξίζει να σημειωθεί ότι από το 1D ψευδοφάσμα $^1\text{H-NMR}$ που προκύπτει με εφαρμογή του HetCA αλγορίθμου για τα δεδομένα των κλασμάτων AHYC_1-AHYC_4, φαίνεται ότι τα αριστολογικά οξέα, τα οποία εκλούστηκαν κυρίως στο AHYC_1 (δ 8.67, 8.60, 7.87, 7.82, 6.40, 4.00), δε συμβάλλουν στη δράση σε αντίθεση με το *trans*-καφεοϋλομαλικό οξύ. Από τα $^1\text{H-NMR}$ των κλασμάτων AHYC_5 και AHYC_6 αναδεικνύεται η παρουσία δύο μεθυλεστέρων του καφεοϋλομαλικού οξέος, του 2-*O*-(*trans*-καφεοϋλο)μαλικού 1-μεθυλεστέρα (δ 3.72, κορυφή μεθοξυ-υποκαταστάτη) (**A**) και του 2-*O*-(*trans*-καφεοϋλο)μαλικού 4-μεθυλεστέρα (δ 3.76, κορυφή μεθοξυ-υποκαταστάτη) (**B**)²³⁴, τα οποία φαίνεται να συνεισφέρουν στη δράση (HetCA 2-5, 3-6, 4-7).



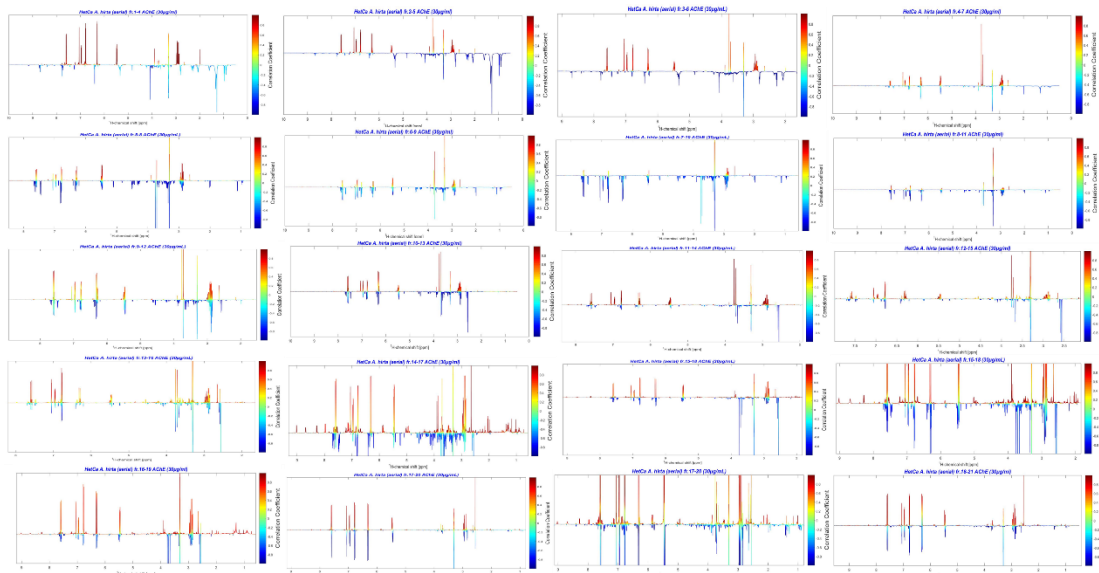
Στα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ των κλασμάτων AHYC_7 και AHYC_8 γίνεται δυνατή η ανίχνευση εστέρα του *trans*-κουμαρούλομαλικού οξέος (1-μεθυλεστέρας του 2-*O*-(*trans*-κουμαρούλο)μαλικού) (C), ο οποίος συνεισφέρει μερικώς στη δράση (HetCA 6-9).



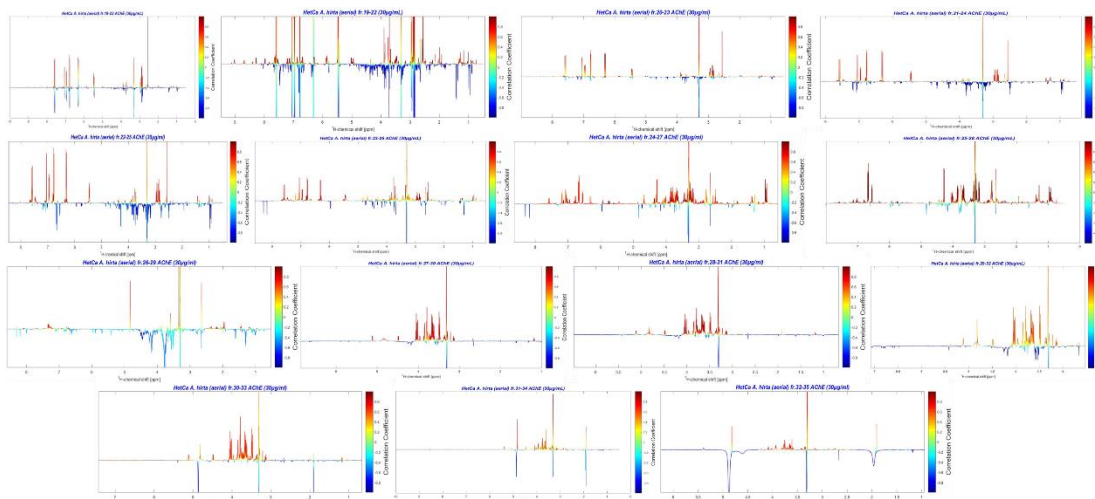
Στο AHYC_9 εμφανίζεται πάλι το *trans*-καφεοϋλομαλικό οξύ, όπως και στο AHYC_4, ενώ στα AHYC_10, AHYC_11, AHYC_12, AHYC_13 εμφανίζονται πάλι οι μεθυλεστέρες του *trans*-καφεοϋλομαλικού οξέος, μαζί με το διμεθυλεστέρα (δ 3.74 και 3.76, κορυφές μεθοξυ-υποκαταστατών) (D), των οποίων οι κορυφές εμφανίζουν έντονη συσχέτιση με τη δράση όπως γίνεται αντιληπτό στα ψευδοφάσματα 10-13, 11-14, 12-15 και 13-16 που προκύπτουν μέσω της HetCA ανάλυσης. Στα επόμενα ψευδοφάσματα παρατηρείται η ίδια εικόνα περίπου, ενώ στο ψευδοφάσμα που προκύπτει από τα κλάσματα AHYC_25-AHYC_28 παρουσιάζεται η συνεισφορά του γλυκοσίδη του 3,4-διϋδροξυ-βενζοϊκού οξέος στη μέτρια αντιχολινεστερασική δράση αυτών των κλασμάτων. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι οι κορυφές στα δ 6.68, 6.66, 6.55, 4.28, 4.07, 3.85, 3.69, 3.65, 3.34, 3.28, 3.26, 3.17 παρουσιάζουν έντονη συσχέτιση με τη δράση. Συμπερασματικά λοιπόν, μέσω της HetCA επεξεργασίας, έγιναν φανερά τα εξής: 1) το συνολικό HetCA ανάδειξε την ισχυρή δράση των παραγώγων καφεοϋλομαλικού οξέος, δηλαδή των ουσιών που είναι υπεύθυνες για τη δράση του ολικού εκχυλίσματος, 2) στα κλάσματα AHYC_4 έως AHYC_9 εκλούεται το *trans*-καφεοϋλομαλικό οξύ, το οποίο είναι και το υπεύθυνο για τη δράση σπαστατικό και 3) ανιχνεύτηκαν ουσίες όπως οι μεθυλεστέρες του *trans*-καφεοϋλομαλικού οξέος και του *trans*-κουμαρούλομαλικού οξέος και ο γλυκοσίδη του 3,4-διϋδροξυβενζοϊκού

οξέος, οι οποίες συνεισφέρουν εν μέρει στη αντιχολινεστερασική δράση του ολικού εκχυλίσματος.

Οι βιβλιογραφικές αναφορές που αφορούν τα υπέργεια τμήματα της αριστολόχιας είναι περιορισμένες στον αριθμό. Τα υπέργεια τμήματα του είδους *A. constricta* εμπειρικά χρησιμοποιούνται στην παραδοσιακή ιατρική ως αντισπασμωδικοί, αντικακρινικοί, ανθελονοσιακοί, αντιφλεγμονώδεις παράγοντες, ως εμμηναγωγά και για την αντιμετώπιση δηγμάτων όφρων. Από τη συγκεκριμένη δρόγη έχουν παραληφθεί ουσίες όπως αριστολακτάμες, αλκαλοειδή πρωτοπίνης, αλκαλοειδή βερβερίνης, σιναπικό οξύ, β-υδροξυ-3',4'-διμεθοξυφαινυλοαιθυλο- γλυκοσίδης, αριστολοχικά οξέα, λιγνάνια, διτερπένια, τετραλόνες, σεσκιτερπένια και ένα υβρίδιο διτερπενίου-λιγνανίου. Τα αλκαλοειδή της πρωτοπίνης έχουν επιδείξει ικανότητα αναστολής της ηλεκτρικά επαγόμενης (ECI), ακετυλοχολινο-επαγόμενης (AChI) και ισταμινο-επαγόμενης σύσπασης του ειλεού¹⁸⁰. Οι ουσίες που ανιχνεύθηκαν στο υδραλκολικό εκχύλισμα της *Ar. hirta* δεν έχουν αναφερθεί ξανά στην οικογένεια, ενώ είναι περιορισμένα τα δεδομένα σχετικά με τις βιολογικές τους ιδιότητες.



Εικόνα 106. 1D ψευδοφάσματα (1-18) ¹H-NMR ετεροδιακύμανσης βιοδραστικότητας (αναστολή έναντι της AChE) και δεδομένων NMR των FCPC κλασμάτων του υδατομεθανολικού εκχυλίσματος AHYC όπως προκύπτουν με εφαρμογή του αλγορίθμου HetCA



Εικόνα 107. 1D ψευδοφάσματα (19-32) $^1\text{H-NMR}$ ετεροδιακύμανσης βιοδραστικότητας (αναστολή έναντι της AChE) και δεδομένων NMR των FCPC κλασμάτων του υδατομεθανολικού εκχυλίσματος AHYC όπως προκύπτουν με εφαρμογή του αλγορίθμου HetCA

10.4 Συμπεράσματα

Τόσο η αναφορά από το Νίκανδρο όσο και η παραδοσιακή χρήση της αριστολόχιας στην αντιμετώπιση των κακοηθειών αποτέλεσαν τους λόγους της επιλογής και της μετέπειτα βοτανικής συλλογής ειδών αριστολόχιας, ριζών και υπέργειων τμημάτων των *A. elongata*, *A. microstoma* και *A. hirta*. Μέσω της σύγκρισης του φυτοχημικού φορτίου των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από τα προαναφερόμενα φυτικά δείγματα, αλλά και της βιολογικής αξιολόγησης στον έλεγχο κυτταροτοξικότητας και ενζυμικής αναστολής, επιλέχθηκε προς μελέτη το είδος *Ar. hirta*. Από το υδατομεθανολικό εκχύλισμα των ριζών της *Ar. hirta* παραλήφθηκαν 7 ουσίες: αριστολοχικό οξύ I, II και IV, αριστολακτάμη IIIA-N-β-D-γλυκοσίδης, 6-O-π-κουμαροϋλο-α-D-γλυκοκυρανόση, 6-O-π-κουμαροϋλο-β-D-γλυκοκυρανόση και ακρετοσίδης. Το εκχύλισμα AHRC και τα CPC κλάσματά του δεν εμφάνισαν αξιοσημείωτη βιολογική δράση. Το υδατομεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων της *Ar. hirta* αποτέλεσε το μοναδικό εκχύλισμα αριστολόχιας που επέδειξε σημαντική αναστολή της AChE. Από αυτό απομονώθηκε η υπεύθυνη για τη δράση ουσία, η οποία είναι το *trans*-καφεοϋλομαλικό οξύ. Μετά την FCPC κλασμάτωση του εκχυλίσματος και την HetCA επεξεργασία των φασματοσκοπικών και βιολογικών δεδομένων των κλασμάτων που προέκυψαν, αναδείχθηκε η συμβολή στη δράση και των μεθυλεστέρων του *trans*-καφεοϋλομαλικού οξέος και του *trans*-κουμαροϋλομαλικού οξέος.

10.5 Βιβλιογραφία

169. Shumei, H., Kelly, L. M. & Gilbert, M. G. Aristolochiaceae. *Flora of China* 5, 246–269 (2003).
170. Mangion, C. P. & Cowie, I. D. Aristolochiaceae. In Short, P.S. & Cowie, I.D. (eds), *Flora of the Darwin Region Volume 1. Northern Territory Herbarium, Department of Natural Resources, Environment, the Arts and Sport* (2011). at <http://www.nt.gov.au/nreta/wildlife/plants>
171. Rivera-Hernández, J. E. & Samain, M. S. Where has *Aristolochia tricaudata* (Aristolochiaceae) gone? New record of a critically endangered species in Oaxaca, Mexico. *Rev. Mex. Biodivers.* 82, 281–285 (2011).
172. Strid, A. & Tan, K. *Flora Hellenica*. (1997).
173. Dimopoulos, P. *et al.* *Vascular Plants of Greece: An annotated checklist*. (2013).
174. CICERO, TULLIUS, M. & PEASE, A. S. M. *Tulli Ciceronis De Divinatione. Liber Primus & Liber Secundus. With commentary by Arthur Stanley Pease*. VI, (U of Illinois Press, Urbana, IL, 1920).
175. Chawla, P., Chawla, A., Shah, G., Baghel, U. S. & Dhawan, R. K. A review on pharmacognosy and biological activities of *Aristolochia*. *Asian J. Res. Biol. Pharm. Sci.* 1, 101–110 (2013).
176. Kuo, P., Li, Y. & Wu, T. Chemical Constituents and Pharmacology of the *Aristolochia* (m ā d ō u ling) species. *J. Tradit. Complement. Med.* 2, 249–266 (2011).
177. Chiang. Aristolochic acid suppresses DNA repair and triggers oxidative DNA damage in human kidney proximal tubular cells. *Oncol. Rep.* 24, 141–153 (2010).
178. Schmeiser, H. H., Schoepe, K.-B. & Wiessler, M. DNA adduct formation of aristolochic acid I and II in vitro and in vivo. *Carcinogenesis* 9, 297–3 (1988).
179. Chung, Y. M. *et al.* A novel alkaloid, aristopyridinone A and anti-inflammatory phenanthrenes isolated from *Aristolochia manshuriensis*. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 21, 1792–1794 (2011).
180. Zhang, G. *et al.* Chemical constituents of *aristolochia constricta*: Antispasmodic effects of its constituents in guinea-pig ileum and isolation of a diterpeno-lignan hybrid. *J. Nat. Prod.* 71, 1167–1172 (2008).
181. Shen, M. Y. *et al.* Involvement of p38 MAPK phosphorylation and nitrate formation in aristolochic acid-mediated antiplatelet activity. *Planta Med.* 74, 1240–1245 (2008).
182. Shamma, M. & Moniot, J. L. *Isoquinoline Alkaloids Research 1972–1977*. 25, (Springer US, 1978).
183. Jung, H. A. *et al.* Anti-Alzheimer and antioxidant activities of *Coptidis Rhizoma* alkaloids. *Biol. Pharm. Bull.* 32, 1433–1438 (2009).
184. Patel, M. B. & Mishra, S. M. Magnoflorine from *Tinospora cordifolia* stem inhibits α -glucosidase and is antiglycemic in rats. *J. Funct. Foods* 4, 79–86 (2012).

185. De La Peña, J. B. I. *et al.* The involvement of magnoflorine in the sedative and anxiolytic effects of *Sinomeni Caulis et Rhizoma* in mice. *J. Nat. Med.* 67, 814–821 (2013).
186. Chen, I.-S., Chen, J.-J., Duh, C.-Y., Tsai, I.-L. & Chang, C.-T. New Aporphine Alkaloids and Cytotoxic Constituents of *Hernandia nymphaeifolia*. *Planta Med.* 63, 154–157 (1997).
187. Protais, P., Arbaoui, J. & Bakkali, E. Effects of various isoquinoline alkaloids on in vitro 3H-dopamine uptake by rat striatal synaptosomes. *J. Nat. Prod.* 58, 1475–1484 (1995).
188. Battu, G. R., Parimi, R. & Chandra Shekar, K. B. *In vivo* and *in vitro* pharmacological activity of *Aristolochia tagala* (*syn: Aristolochia acuminata*) root extracts. *Pharm. Biol.* 49, 1210–1214 (2011).
189. Calder, M. & Burgos, E. A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol. 298–344 (2011).
190. Zhai, H. *et al.* Neuroprotective Effects of 2,5-Diaryl-3,4-dimethyltetrahydrofuran Neolignans. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 289–293 (2005).
191. Sartorelli, P., Salomone Carvalho, C., Quero Reimão, J., Lorenzi, H. & Tempone, A. G. Antitrypanosomal activity of a diterpene and lignans isolated from *Aristolochia cymbifera*. *Planta Med.* 76, 1454–1456 (2010).
192. Nascimento, I. R., Murata, A. T., Bortoli, S. A. & Lopes, L. M. X. Insecticidal activity of chemical constituents from *Aristolochia pubescens* against *Anticarsia gemmatilis* larvae. *Pest Manag. Sci.* 60, 413–416 (2004).
193. Messiano, G. B. *et al.* Evaluation of insecticidal activity of diterpenes and lignans from *Aristolochia malmeana* against *Anticarsia gemmatilis*. *J. Agric. Food Chem.* 56, 2655–2659 (2008).
194. Handayani, D. *et al.* Four new bioactive polybrominated diphenyl ethers of the sponge *Dyside A* herbacea from west Sumatra, Indonesia. *J. Nat. Prod.* 60, 1313–1316 (1997).
195. Kuniyoshi, M., Yamada, K. & Higa, T. A biologically active diphenyl ether from the green alga *Cladophora fascicularis*. *Experientia* 41, 523–524 (1985).
196. Gang, Z. I. Isolation of Bioactive Components from Ecuadorian *Aristolochia constricta* II. Studies on Guanidine-Catalyzed Asymmetric Reactions I. Isolation of Bioactive Components from Ecuadorian *Aristolochia constricta* II. Studies on Guanidine-Catalyzed Asymme. (Chiba university, 2010).
197. Fournet, a *et al.* Antileishmanial activity of a tetralone isolated from *Ampelocera edentula*, a Bolivian plant used as a treatment for cutaneous leishmaniasis. *Planta Med.* 60, 8–12 (1994).
198. Yi, B. *et al.* Antioxidant phenolic compounds of cassava (*Manihot esculenta*) from Hainan. *Molecules* 16, 10157–10167 (2011).
199. Shi, Y., Chen, Q. X., Wang, Q., Song, K. K. & Qiu, L. Inhibitory effects of cinnamic acid and its derivatives on the diphenolase activity of mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase. *Food Chem.* 92, 707–712 (2005).
200. Adisakwattana, S. *et al.* Structure-activity relationships of trans-cinnamic acid derivatives on α -glucosidase inhibition. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 14, 2893–2896 (2004).

201. Anantharaju, P. G., Gowda, P. C., Vimalambike, M. G. & Madhunapantula, S. V. An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. *Nutr. J.* 15, 99 (2016).
202. Wu, T.-S., Damu, A. G., Su, C.-R. & Kuo, P.-C. Terpenoids of *Aristolochia* and their biological activities. *Nat. Prod. Reports* 21, 594–624 (2004).
203. Saeidnia, S. The Story of Beta-sitosterol- A Review. *European J. Med. Plants* 4, 590–609 (2014).
204. Navarro-García, V. M., Luna-Herrera, J., Rojas-Bribiesca, M. G., Álvarez-Fitz, P. & Ríos, M. Y. Antibacterial activity of *Aristolochia brevipes* against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecules* 16, 7357–7364 (2011).
205. Heinrich, M., Chan, J., Wanke, S., Neinhuis, C. & Simmonds, M. S. J. Local uses of *Aristolochia* species and content of nephrotoxic aristolochic acid 1 and 2-A global assessment based on bibliographic sources. *J. Ethnopharmacol.* 125, 108–144 (2009).
206. Kokcu, B., Esen, O. & Uysal, I. Medicinal plants sold in Çanakkale/Turkey city center herbalists. *Biol. Divers. Conserv.* 3, 80–91 (2015).
207. Akyol, Y. & Altan, Y. Ethnobotanical studies in the Maldan Village (Province Manisa, Turkey). *MARMARA Pharm. J.* 1, 21–25 (2013).
208. Tümen, G., Malyer, H., Hüsnü, K., Bafier, C. & Aydin, S. Ö. Z. Plants used in Anatolia for wound healing. *Proc. IVth Int. Congr. Ethnobot. (ICEB 2005)* 217–221 (2006).
209. Fakir, H., Korkmaz, M. & Güller, B. Medicinal Plant Diversity of Western Mediterranean Region in Turkey. *J. Appl. Biol. Sci.* 3, 3–4 (2009).
210. Aydin, Ö. Z., Rmenc, T. D., Tümen, G. & Bafier, K. H. C. Plants used as analgesic in the folk medicine of Turkey. *Proc. IVth Int. Congr. Ethnobot.* 167–171 (2006).
211. Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J. & Kowalska, T. Thin layer chromatography in phytochemistry. *Chromatogr. Sci. Ser.* xxii, 874 p. (2008). doi:10.1201/9781420046786
212. Chen, Z.-L. & Zhu, D.-Y. Chapter 2 *Aristolochia* alkaloids. *The alkaloids: chemistry and pharmacology.* 31, 29–65 (1987).
213. Kumar, V., Poonam, Prasad, A. K. & Parmar, V. S. Naturally occurring aristolactams, aristolochic acids and dioxaporphines and their biological activities. *Nat. Prod. Rep.* 20, 565 – 583 (2003).
214. Georgopoulou, C., Aligiannis, N., Fokialakis, N. & Mitaku, S. Acretoside, a new sucrose ester from *Aristolochia cretica*. *Nat. Prod. Res.* 19, 795–799 (2005).
215. World Health Organization, I. A. for R. on C. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *IARC Press* 82, 1–556 (2002).
216. Vishwanath, B. S., Rao, A. G. A. & Gowda, T. V. Interaction of phospholipase A2 from *Vipera russelli* venom with aristolochic acid: a circular dichroism study. *Toxicon* 25, 939–946 (1987).

217. Girish, K. S. & Kemparaju, K. Inhibition of *Naja naja* venom hyaluronidase by plant-derived bioactive components and polysaccharides. *Biochem.* 70, 948–952 (2005).
218. De Pascual Teresa, J., Urones, J. G. & Fernandez, A. An aristolochic acid derivative from *Aristolochia longa*. *Phytochemistry* 22, 2745–2747 (1983).
219. Zhang, H.-C. *et al.* Aristolactam-type alkaloids and aristolochic acids from *Aristolochia moupinensis* and *Aristolochia cathcartii*. *Biochem. Syst. Ecol.* 65, 198–201 (2016).
220. Pistelli, L., Nieri, E., Bilia, A. R., Marsili, A. & Scarpato, R. Chemical Constituents of *Aristolochia rigida* and Mutagenic Activity of Aristolochic Acid IV. *J. Nat. Prod.* 56, 1605–1608 (1993).
221. Shi, L., Kuo, P., Tsai, Y., Damu, A. G. & Wu, T. The alkaloids and other constituents from the root and stem of *Aristolochia elegans*. 12, 439–446 (2004).
222. Tian-Shung, W., Li-Fei, O. & Che-Ming, T. Aristolochic acids, aristolactam alkaloids and amides from *Aristolochia kankauensis*. *Phytochemistry* 36, 1063–1068 (1994).
223. Tian-Shung, W., Amooru G., D., Chung-Ren, S. & Ping-Chung, K. in *Studies in Natural Products Chemistry* 32, 855–1018 (2005).
224. Michl, J., Ingrouille, M. J., Simmonds, M. S. J. & Heinrich, M. Naturally occurring aristolochic acid analogues and their toxicities. *Nat. Prod. Rep.* 31, 676–693 (2014).
225. Γεωργοπούλου, Α. Α. Απομόνωση ταξοειδών από φυσικές πηγές και μελέτη της αντιλεϊσμανιακής δράσης τους– Παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι της ταξόλης Β. Φαρμακογονωστική μελέτη των δευτερογενών μεταβολιτών φυτών του γένους *Pistacia* και *Aristolochia*. (ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ, 2007).
226. Shimomura, H., Sashida, Y. & Adachi, T. Phenylpropanoid glucose esters from *Prunus buergeriana*. *Phytochemistry* 27, 641–644 (1988).
227. You-Hua, C., Jin, Q., Jing, H. & Bo-Yang, Y. Structural characterization and identification of major constituents in Radix Scrophulariae by HPLC coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Chin. J. Nat. Med.* 12, 47–54 (2014).
228. Gouda, Y. G. *et al.* Phenylpropanoid and phenylethanoid derivatives from *Kigelia pinnata* DC. fruits. *Nat. Prod. Res.* 20, 935–939 (2006).
229. Abdel-Farid, I. B., Hye, K. K., Young, H. C. & Verpoorte, R. Metabolic characterization of *Brassica rapa* leaves by NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 55, 7936–7943 (2007).
230. Zeller, W. E. Synthesis of (+)- and (-)-phaselic acid. *Synth. Commun.* 43, 1345–1350 (2013).
231. Seidel, V. *et al.* Phenylpropanoids from *Ballota nigra* L. inhibit in vitro LDL peroxidation. *Phyther. Res.* 14, 93–98 (2000).
232. Daels-Rakotoarison, D. a *et al.* Neurosedative and antioxidant activities of phenylpropanoids from *Ballota nigra*. *Arzneimittelforschung.* 50, 16–23 (2000).
233. Değirmenci, N. S., Akal, Z. Ü. & Alpsoy, A. Cytotoxic and Apoptotic Effects of caffeic acid and caffeoyl malic acid on brain glioblastoma (U87 MG). *Bull. Pharm. Res.* 6, 38–40 (2009).
234. Lee, K. H. *et al.* Hydroxycinnamoylmalic Acids and Their Methyl Esters from Pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) Fruit Peel. *J Agric Food Chem* 59, 10124–10128 (2011).

11 *Anchusa undulata* ssp. *hybrida* (Boraginaceae)

11.1 Σκοπός

Φυτικά είδη που ανήκουν στην οικογένεια Boraginaceae είναι αρκετά διαδεδομένα στη λαϊκή θεραπευτική διαφόρων κοινωνιών, κυρίως ως θεραπείες κατά των δηλητηριωδών ζώων. Ο Νίκανδρος αναφέρει τη χρήση τους ως αντίδοτα κατά των δηλητηριωδών δηγμάτων. Στα πλαίσια της διατριβής συλλέχθηκαν τα είδη *Anchusa undulata* ssp. *hybrida* και *Echium plantagineum*. Σκοπός ήταν η παραλαβή ενός εύρους δευτερογενών μεταβολιτών προκειμένου να εντοπιστούν αυτοί που ευθύνονται για τη δράση. Έτσι εκχυλίστηκαν και τα δύο φυτικά είδη, τόσο οι ρίζες όσο και τα υπέργεια τμήματα, και μελετήθηκε περαιτέρω το μεθανολικό εκχύλισμα της ρίζας της *Anchusa undulata* ssp. *hybrida*, καθώς επέδειξε ισχυρή δράση ενάντια στην AChE.

11.2 Θεωρητικό Μέρος

11.2.1 Αναφορές της δρόγης στα υπό μελέτη κείμενα

Ο Νίκανδρος στους στίχους 636-647 και 837-847 των *Θηριακών* αναφέρει ένα φυτικό είδος που σύμφωνα με τις περιγραφές παρουσιάζει ομοιότητες με τη σημερινή αγχούσα. Συγκεκριμένα στους στίχους 636-647 προτείνει τη χρήση της ρίζας του φυτού ως θεραπεία έναντι των δηγμάτων και στους στίχους 837-847 υποστηρίζει τη χρήση της αγχούσας για την αντιμετώπιση δηγμάτων που προέρχονται από αραχνοειδή και λοιπά ζώα που αμύνονται με το κεντρί τους.

Νίκανδρος Αρχαίο Κείμενο 636-647

Νῦν δ' ἄγε τοι ρίζας ἐρέω ὀφείσασιν ἄρωγούς.
 ἔνθα δὴ ἔχθια πιφαύσκου· τῆς δὲ τὸ μὲν που
ἀγχούση προσέεικεν ἀκάνθηεν πετάλειον,
 παύρον ἐπεὶ, τυτθὸν δὲ καὶ ἐν χθονὶ πυθμένα τείνει.
 ἢ δ' ἔτερῃ πετάλοισι καὶ ἐν κάλοισι θάλλει,
 ὕψηλῃ· ὄλιγῳ δὲ πέρις καλχάινεται ἄνθει,
 βλάστη δ' ὡς ἔχθος σφεδανὸν δ' ἐφόπερθε κάρηρα·
 τῶν μὲν ἀπ' ἀνδρακάδα προταμῶν ἰσῆρα χραισαμῆν,
 ἢ σφέλα ἢ ἔλιμῳ κέασας ἢ ῥαγάδι πέτρῃ,
 καὶ τε σὺ γ' ἠρύγγου καὶ ἀλθιέντους ἀκάνθου
 ρίζεα λειψάτω, φέροις δ' ἰσορρεπές ἄχθος
 ἀμφοῖν, καὶ κλώθοντος ἐν ἀπέτρησιν ἐρίνου·

Νίκανδρος Μετάφραση 636-647

Και τώρα θα σου πω για ρίζες χρήσιμες ενάντια στα φιδία.
 Λοιπόν, δύο είδη του **φιδιάγκαθου** θα σου αποκαλύψω· το ένα, το κοντούτσικο, σ' αγαθερά του πέταλα, μοιάζει με την **ἀγχούσα** και τη μικρή τη ρίζα του λιγάκι απλώνει μες στη γη. Το άλλο, το σειθεές, τα πολλά κλαδιά του και τα φύλλα πολύ πάνω απ' το χώμα υψώνει, τα άνθη του τα πορφύρα για λίγο τα κρατάει και ο βλαστός στη μορφή του ερπετού του σπυλαχχού· κι από τα δύο αυτά φυτά, φάρμακο για να φτιάξεις, κόψε μερίδα ισόποση, τρίψτα σε ξύλινο γουδί ή λίθινο ή πήλινο, και κάνε τα πολύ μαζί με ρίζες του λουλουδιού της ανοίξης και της ιαματικής μουτρούνας· αυτές τις ρίζες στα ίσα να ζυγιάσεις· σε υγρές και φωτεινές απλάδες θα τις βρεις, όπου χλοάζει ο έρινος.

Νίκανδρος Αρχαίο Κείμενο 837-847

Ὅϊον ἐγὼ τὰ ἔκαστα διεἴσομαι ἄρκια νοῦσων.
 δὴ γὰρ οὗτ' **ἀγχούσης θριδακηΐδα** λάξο χαίτην,
 ἄλλοτε πενταπέτηλον, οὗτ' ἄνθεα φοινά βάτοιο,
 ἄρκτιον, ὄραλίδας τε καὶ ὀρμενόνενα λυκαψόν,
 κίκαια τὸρδειλὸν τε περιβρυές, ἐν δὲ χαμηλὴν
 ῥεῖα πίτυν, φηγοῦ τε βαθὺν περὶ φλοῖον ἀράξας,
 σὺν δ' ἄρα καυκαλίδας τε καὶ ἐκ σταφυλίνου ἀμήσας
 σπέρματα καὶ τρεμίθιο νέον πολυειδέα καρπὸν·
 ἢ ἔτι καὶ φοινίσσον ἀλὸς καταβάλλεο φύκος,
 ἄχραξ τ' ἀδίατον, ἴν' οὐκ ὄμβροιο ῥαγέντος
 λεπταλέῃ πίπτουσα νοτὶς πετάλοισιν ἐφίξει.

Νίκανδρος Μετάφραση 837-847

Για όλα, τα παραπάνω ολέθρια, όπλα για να 'χεις ν'αμυνθείς τώρα θε να 'στορήσω. Πάρε λοιπόν **βοϊδόγλωσσα**, όπου τα φύλλα της με το μαρούλι μοιάζουν, κόψε και το πεντάφυλλο, τα κόκκινα ανθάκια του ρούβου του θαμνώδη, κολιτοΐδα, οξυλάπαθο καθώς και το μανουίνι με τα βλαστάρια τα μακριά, που πα στη γη ακουμπάνε· πάρε και καυκαλίθρα, τέρδυλο το πολύφυλλο και διωδεκάνθη ακάμα, χάραξε τη βελανιδιά βαθιά και πάρε τον φλοιό της, βάλε και μοσχολάχανο, λιώσε και σπόρους αγριοκάρου, και φρέσκο καρπό της κοκκορεβυθιάς, που 'ναι τα είδη της πολλά· πάρε και φύκι τελικά της θάλασσας κοκκινωπό και καθαρό μαλλόχορτο· μη το μαζέψεις με βροχή, αφού τα πεταλάκια του ποτίζονται, νοτίζονται και χρήσιμα δεν είναι.

Εικόνα 108. Αποσπάσματα των Θηριακών όπου αναφέρεται η χρήση των ειδών της οικογένειας *Boraginaceae*

Ο Διοσκουρίδης αναφέρει τη χρήση της ρίζας και των φύλλων της αγχούσας για την αντιμετώπιση δηλητηριωδών δηγμάτων.

Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί ότι δεν είναι βέβαιο το αν η σημερινή αγχούσα ταυτίζεται με την αγχούσα που περιέγραψαν ο Νίκανδρος και ο Διοσκουρίδης καθώς πολλοί υποστηρίζουν ότι πρόκειται για είδη του γένους *Echium*. Η επιλογή της μελέτης ενός είδους του γένους *Anchusa* στα πλαίσια της παρούσας εργασίας αποτελεί μια πρώτη προσέγγιση δεδομένης και της ομοιότητας τόσο στο χημικό φορτίο όσο και στις δράσεις μεταξύ των ειδών των γενών *Echium* και *Anchusa*.

11.2.2 Δρογοβοτανική-Γεωγραφική εξάπλωση-Βιότοπος

Η **οικογένεια** *Boraginaceae* περιλαμβάνει κυρίως πόες, σπάνια θάμνους, συχνά με χνοώδες φύλλωμα. Τα φύλλα είναι κατ'εναλλαγήν, σπάνια αντίθετα, άμισχα, απλά, με ακέραιο ή οδοντωτό περιθώριο, χωρίς παράφυλλα. Τα άνθη σχηματίζουν κυματοειδείς ταξιανθίες σε μορφή σκορπιοειδούς κύματος, συχνά ακτινόμορφα, σπάνια ζυγόμορφα (*Echium*, *Anchusa*). Τα στέπαλα και τα πέταλα είναι 5. Ο κάλυκας είναι 5-οδοντωτός ή 5-λοβος, συνήθως μόνιμος. Η στεφάνη είναι 5-λοβη, κυλινδρική, κωδωνοειδής, υποκρατηροειδής ή τροχοειδής, συνήθως με ευκρινή σωλήνα και χείλος. Ο ανθικός σωλήνας εμφανίζει συχνά 5 κλίμακες, κυματισμούς και σειρές με εσωτερικές τρίχες ενώ μερικές φορές σχηματίζει ένα δακτύλιο στη βάση. Οι στήμονες

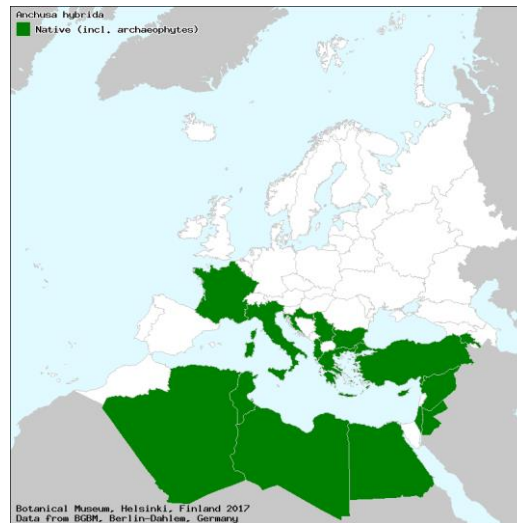
είναι 5 εσωτερικά και αντιδιαμετρικά με τους λοβούς της στεφάνης, έγκλειστοι ή σπάνια προεξέχοντες στο σωλήνα της στεφάνης. Η ωθήκη είναι επιφυής, πολύχρωμη με 2 έως 4 διαμερίσματα με απλό στύλο, εκφυόμενο από το κέντρο των 4 λοβών της ωθήκης, σπάνια επάκριο και θραυστόκαρπο που αποτελείται από 2 ή 4 κάρυα, που συχνά φέρουν πτερύγια, αγκάθια ή γλωχίνες (ομάδες τριχών).

Το **γένος** *Anchusa* L. περιλαμβάνει ετήσιες, διετείς ή πολυετείς πόες, σπανίως ξυλώδεις στη βάση, αραιά καλυμμένες με σκληρές τρίχες ή δασύτριχες, σπάνια χνοώδεις. Οι βλαστοί είναι σε όρθια έκφυση ή απλωτοί. Τα φύλλα απαντώνται κατ' εναλλαγήν. Τα άνθη βρίσκονται σε μασχαλιαίες ή επάκριες κυματοειδείς ταξιανθίες, με λογχοειδή βράκτια φύλλα σε όλο το μήκος τους. Ο κάλυκας είναι 5-μερής, οι λοβοί του κάλυκα διηρημένοι έως το 1/3 του μήκους του ή σχεδόν έως την βάση, συχνά λίγο επιμηκυνόμενοι στην καρποφορία. Η ανθική στεφάνη μπορεί να είναι πορφυρή, κυανή, κίτρινη ή λευκή, με κυλινδρικό, ευθύ ή κυρτό ανθικό σωλήνα, συνήθως μεγαλύτερο του κάλυκα και τροχοειδή έως καμπανοειδή άκρα χωρισμένα σε ίσους ή άνισους λοβούς, με 5 θηλώδη ή τριχωτά λέπια στο φάρυγγα. Οι στήμονες εκφύονται από το μέσον του σωλήνα της στεφάνης ή και κάτω από αυτό, με νήματα βραχέα. Ο στύλος είναι έγκλειστος ή λίγο προεξέχων, το στίγμα κεφαλωτό με σχισμή στο μέσον. Τα κάρυα είναι ωσειδή έως νεφροειδή ή ημισφαιρικά, όρθια ή πλάγια, δικτυωτά ή ρικνά, συνήθως ελικοειδή, με στεφάνη σε μορφή κολάρου στη βάση.

Το **υποείδος** *Anchusa undulata* ssp. *hybrida* (Ten) Cout. (1813) (άγχουσα η κυματιστή υποείδος η υβριδική) είναι διετές ή πολυετές χνοώδες φυτό με ταυτόχρονα κοντές και μακριές σμήριγγες που είναι ως επί το πλείστον σχεδόν λευκές ή με φυματιώδη βάση. Οι όρθιοι βλαστοί έχουν μήκος 10-50 cm και το μέγεθος των φύλλων είναι 50-150 mm, συχνά κυματοειδή και οδοντωτά. Χαρακτηρίζεται από τις πολλές και πυκνές ταξιανθίες με πολύ κοντούς ανθικούς άξονες και βράκτια φύλλα κοντύτερα του κάλυκα, τα οποία είναι ωσειδή έως λογχοειδή και καρδιόσχημα στη βάση. Η ανθική στεφάνη έχει χρώμα μπλε, μωβ ή ιώδες με ανθικό σωλήνα 5-8 mm και άκρα 3-5 mm σε διάμετρο. Οι στήμονες εκφύονται περίπου από τη μέση του ανθικού σωλήνα. Οι καρποί είναι θραυστόκαρποι 2 x 3-4 mm, πλαγίως ωσειδείς.

Το υποείδος είναι μεσογειακό με εξάπλωση σε όλη την Ελλάδα. Το είδος εξαπλώνεται σε όλη τη Μεσόγειο εκτός της Ιβηρικής χερσονήσου, στην οποία περιορίζεται το δεύτερο υποείδος *Anchusa undulata* subsp. *undulata*. Συναντάται ανθισμένο στα μέσα της άνοιξης (Μάρτιο) σε

άγονες χέρσες περιοχές ή περιοχές με ανθρωπογενή δραστηριότητα (αγροί, πρανή, άκρες δρόμων). Σύμφωνα με το 'The Plant List' το συνώνυμο του είδους είναι το *Anchusa hybrida* Ten.



Εικόνα 109. Μεσογειακή εξάπλωση του είδους *Anchusa undulata* ssp. *hybrida*

Συστηματική κατάταξη σύμφωνα με το σύστημα που έχει υιοθετήσει το USDA (<https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=ANCHU>):

Βασίλειο (Kingdom)	Φυτά (<i>Plantae</i>)
Υποβασίλειο (Subkingdom)	Τραχεόφυτα (<i>Tracheobionta</i>)
Υπεράθροισμα (Superdivision)	Σπερματοφύτα (<i>Spermatophyta</i>)
Άθροισμα (Division)	Ανθοφόρα φυτά (<i>Magnoliophyta</i>)
Κλάση (Class)	Δικοτυλήδονα (<i>Magnoliopsida</i>)-
Υποκλάση (Subclass)	<i>Asteridae</i>
Τάξη (Order)	<i>Lamiales</i>
Οικογένεια (Family)	Boraginaceae
Γένος (Genus)	<i>Anchusa</i> L.
Είδος (Species)	<i>Anchusa undulata</i> L.
Υποείδος (Subspecies)	<i>Anchusa undulata</i> subsp. <i>hybrida</i> (Ten) Cout.



Εικόνα 110. *Anchusa undulata ssp. hybrida*

11.2.3 Δρογοϊστορία-Δρογοετυμολογία

Για το υποείδος *Anchusa undulata ssp. hybrida* ισχύουν τα εξής:

- *Anchusa* > άγχουσα (φυτό που αναφέρουν οι αρχαίοι Έλληνες συγγραφείς με φαρμακευτικές και καλλωπιστικές ιδιότητες)
- *undulata* >> *undula* κυμάτιον, κυματάκι > *unda* κύμα = κυματιστή (από τα φύλλα της)
- *hybrida* > *hibrita* & *ibrida* (λατιν.) υβρίδιο = υβριδική

Το όνομα του φυτού προέρχεται από την αρχαία λέξη *αγχουσίζομαι* που σημαίνει χρησιμοποιώ άγχουσα, βάφω, χρωματίζω (κυρίως το πρόσωπο).

Ο Διοσκουρίδης αναφέρει ότι η προσθήκη του φυτού στο κρασί το έκανε «ευφρόσυνο». Ακόμη, περιγράφει ότι σε περίπτωση δήγματος από δηλητηριώδες ζώο μπορούσε κάποιος να λάβει το φυτό αυτό εσωτερικά ή να τοποθετήσει το μασημένο φυτό σαν πολτό πάνω στην πληγή. Εάν ο συγκεκριμένος πολτός εισαχθεί στο στόμα ενός φιδιού, αυτό θα πεθάνει αμέσως, ενώ είναι δυνατόν να εξουδετερώσει τα σκουλήκια του εντέρου. Συνιστούσε επίσης το φυτό σε προβλήματα πόνου της πλάτης, μώλωπες από πτώσεις, ευλογία, ιλαρά και τσιμπήματα εντόμων. Στην αρχαιότητα θεωρούσαν την άγχουσα ως ένα από τα καλύτερα καλλυντικά. Ο Πλίνιος αναφέρει ότι τη χρησιμοποιούσαν στη βαφική, ενώ ο Γαληνός τη γνώριζε σαν καλλυντικό. Στη

λαϊκή ιατρική η άγχουσα χρησιμοποιείται κατά της διάρροιας, για τη θεραπεία δοθιήνων, φλεγμονών και σε ευαίσθητα δέρματα²⁴⁷. Χορηγούνταν επίσης από το στόμα ως καθαρτικό, για τον βήχα και το έλκος στομάχου.

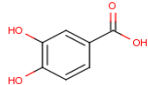
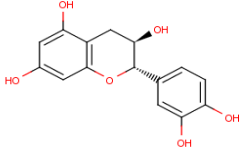
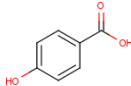
11.2.4 Δρογοχημεία

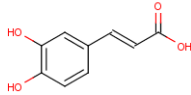
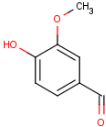
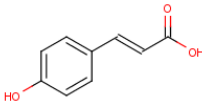
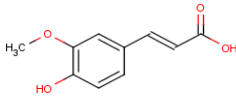

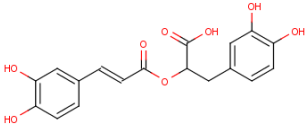
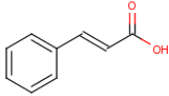
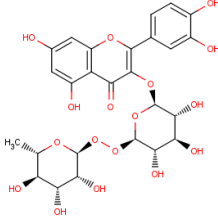
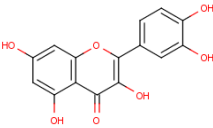
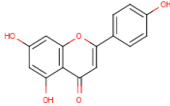
Από το γένος *Anchusa* έχουν απομονωθεί οι εξής κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών:

- Αλκαλοειδή πυρρολιζιδίνης
- Ναφθοκινόνες
- Φλαβονοειδή
- Τριτερπένια
- Φαινολικές ενώσεις
- Λιγνάνια

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες που έχουν ταυτοποιηθεί στο είδος *Anchusa undulata* subsp *hybrida* ανήκουν στα τριτερπένια και στις φαινολικές ενώσεις^{235 236}:

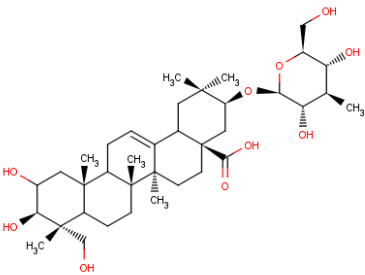
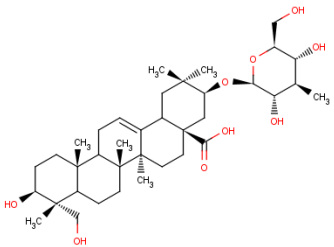
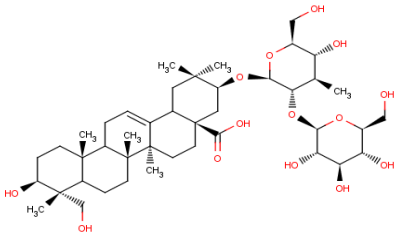
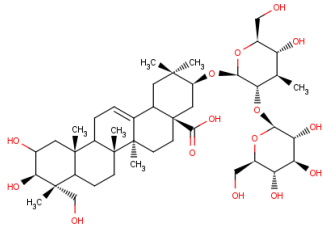
Πίνακας 39. Φαινολικές ενώσεις που έχουν απομονωθεί από την *Anchusa undulata* subsp. *hybrida*

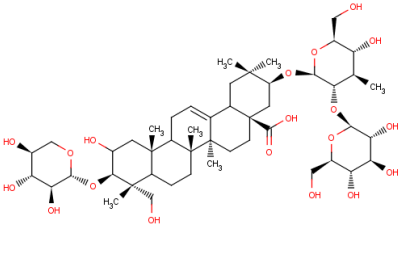
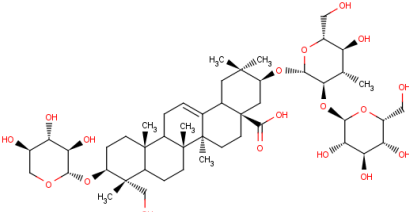
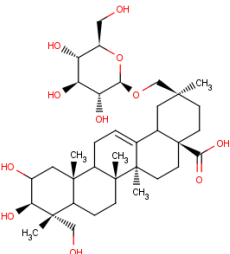
Φαινολικές ενώσεις	
Όνομα	Χημικός τύπος
Πρωτοκατεχικό οξύ	
Κατεχίνη	
π-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ	

Καφεϊκό οξύ	
Βανιλίνη	
π-κουμαρικό οξύ	
Φερουλικό οξύ	
Βενζοϊκό οξύ	
Ροσμαρινικό οξύ	
Κιναμμωμικό οξύ	
Ρουτίνη	
Κερκετίνη	
Απιγενίνη	

Το μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων της *Anchusa azurea* που έχει ως κύριο συστατικό το ροσμαρινικό οξύ, έδειξε σε *in vivo* πειράματα ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση²³⁷. Αντιφλεγμονώδη δράση παρουσιάζει και η ρουτίνη, όπως επίσης αντιοξειδωτική, αντιδιαβητική και νευροπροστατευτική²³⁸. Τέλος, η κερκετίνη έχει επιδείξει μια μεγάλη ποικιλία βιολογικών δράσεων, όπως αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αναλγητική, αντιαλλεργική και αντικαρκινική. Επιπλέον φαίνεται να δρα ευεργετικά σε καρδιαγγειακές παθήσεις, διαβήτη και υπέρταση²³⁹.

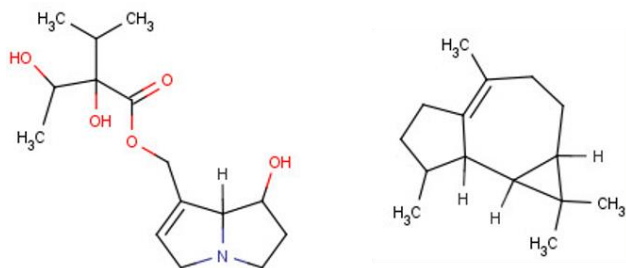
Πίνακας 40. Τριτερπένια που έχουν απομονωθεί από την *Anchusa undulata subsp. hybrida*

Τριτερπένια	
Όνομα	Χημικός τύπος
Αγχουσοσίδης 3	
Αγχουσοσίδης 4	
Αγχουσοσίδης 5	
Αγχουσοσίδης 8	

Ανχουσοσίδης 9	
Ανχουσοσίδης 11	
Βισκοσίδης	

Τα παραπάνω τριτερπένια απομονώθηκαν από μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων της *Anchusa undulata* το οποίο έδειξε αντιβακτηριακή δράση έναντι μικροοργανισμών όπως *Salmonella thyphimirium*, *Enterobacter aerogenes* και *Staphylococcus aureus*²³⁵. Τριτερπένια που απομονώθηκαν από άλλα είδη *Anchusa* έδειξαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση²⁴⁰.

Αλκαλοειδή πυρρολιζιδίνης τα οποία έχουν παραληφθεί από το γένος *Anchusa* είναι τα σουπινίνη (*Anchusa arvensis*, *Anchusa melleri*), σουπινιδίνη (*Anchusa strigosa*), τραχελανθαμίνη (*Anchusa hispida*), βριδιφλορίνη (*Anchusa milleri*), 7-ακετυλοϊντερμεδίνη (*Anchusa arvensis*), 7-ακετυλολικοψαμίνη (*Anchusa arvensis*, *Anchusa hispida*, *Anchusa officinalis*), κουρασάβινη (*Anchusa officinalis*), ιντερμεδίνη (*Anchusa arvensis*, *Anchusa hispida*, *Anchusa officinalis*), λικοψαμίνη (*Anchusa arvensis*, *Anchusa hispida*, *Anchusa officinalis*). Οι ουσίες αυτές έχουν εμφανίσει σπασμολυτικές, αντισταμινικές, αντι-HIV, αντικρκικές ιδιότητες και ικανότητα αναστολής της γλυκοσιδάσης²⁴¹.



Εικόνα 111. Αλκαλοειδή πυρρολιζιδίνης (λυκοψαμίνη, βριδιφλορίνη) που έχουν απομονωθεί από *Anchusa spp.*

11.2.5 Δρογοφαρμακολογία

Εθνοφαρμακολογικές-Παραδοσιακές Χρήσεις Χρήσεις

Υπάρχουν αρκετές αναφορές για την παραδοσιακή χρήση του γένους στην ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου. Έχει χρησιμοποιηθεί στην παραδοσιακή αραβική θεραπευτική έναντι δερματικών παθήσεων και σε προβλήματα του αναπνευστικού²⁴². Στην Ιορδανία τα φύλλα των ειδών *Anchusa italica*, *Anchusa strigosa* και *Anchusa aegyptiaca* έχουν εφαρμοσθεί ως καταπλάσματα για την επούλωση πληγών εγκαυμάτων και αποστημάτων^{243 244}. Επιπλέον αφέψημα φύλλων των *A. italica* και *A. strigosa* έχουν προταθεί ως αποχρεμπτικά και αντιβηχικά. Στο Ισραήλ χρησιμοποιείται εκχύλισμα φύλλων σε δερματικές παθήσεις, πληγές και σε περιπτώσεις αρθρίτιδας²⁴⁵. Στην Τουρκία χρησιμοποιείται ως επουλωτικό με τη μορφή αλοιφής που περιέχει κρόκο αυγού και κερύ μέλισσας²⁴⁶. Τέλος περιγράφεται στο Ιατροσοφικόν, συλλογή συνταγών από μοναστήρι της Κύπρου γραμμένες την περίοδο 1571-1878, ότι ρίζες ειδών του γένους *Anchusa*, η οποία αναφέρεται με την ονομασία βουδόγλωσσα, εφαρμόζονταν εξωτερικά για την επούλωση αμυχών και πληγών²⁴⁷.

Σύγχρονες Φαρμακολογικές μελέτες

Οι μελέτες βιολογικής αξιολόγησης που έχουν πραγματοποιηθεί σε εκχυλίσματα και απομονωμένους δευτερογενείς μεταβολίτες του γένους *Anchusa* είναι περιορισμένες. Σε δοκιμασίες ελέγχου αναστολής των ενζύμων ακετυλοχολινεστεράση και βουτυρυλοχολινεστεράση, το μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων της *Anchusa undulata ssp. hybrida* εμφάνισε ισχυρότερη δράση από αυτό των ριζών ενώ και τα δύο εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική αντιδιαβητική δράση μέσω αναστολής των ενζύμων α-αμυλάση και α-γλυκοσιδάση²⁴⁸. Εκχυλίσματα του είδους *Anchusa italica* έχουν επιδείξει δράση αντιοξειδωτική, κυτταροτοξική έναντι των κυτταρικών σειρών MCF-7 και HepG2,

νευροπροστατευτική *in vivo* σε μύες, αντική και αντιφλεγμονώδη. Εκχύλισμα ριζών του είδους *Anchusa strigosa* έχει εμφανίσει σημαντικές αντιμικροβιακές και γαστροπροστατευτικές ιδιότητες. Υδατικό εκχύλισμα του φυτού έχει επιδείξει υποτασικές ιδιότητες, ενώ το υδατικό εκχύλισμα των ανθέων έχει παρουσιάσει αντιδιαβητικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες²⁴⁰. Εκχυλίσματα του είδους *Anchusa officinalis* έχουν εμφανίσει αξιοσημείωτες αντιμικροβιακές ιδιότητες²⁵⁰.

11.3 Πειραματικό Μέρος

11.3.1 Εκχυλίσεις και Έλεγχος χημικού φορτίου ολικών εκχυλισμάτων

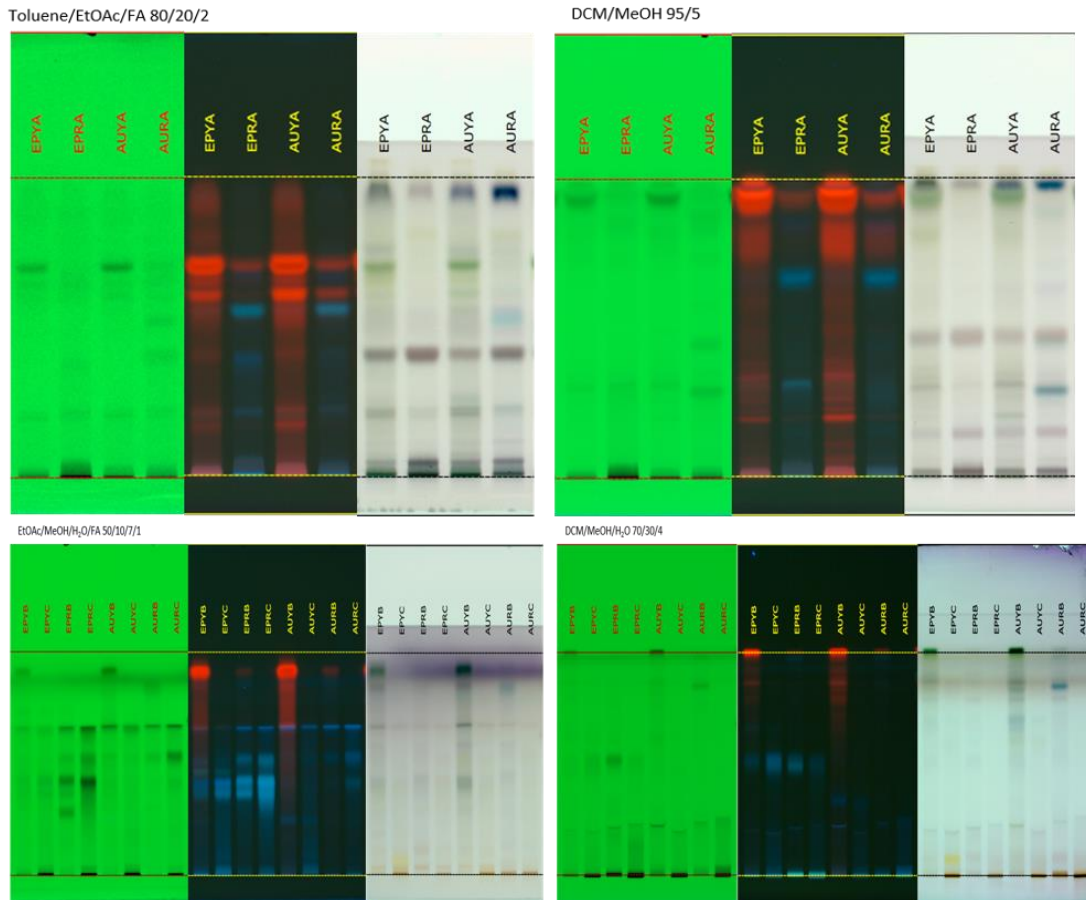
Για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης συλλέχθηκαν δύο είδη της οικογένειας Boraginaceae, η *Anchusa undulata* ssp. *hybrida* και το *Echium plantagineum*, τα οποία συγκρίθηκαν φυτοχημικά και βιολογικά τόσο μεταξύ τους, όσο και με ήδη υπάρχοντα στη χημειοθήκη του εργαστηρίου εκχυλίσματα των *Anchusa caespitosa* και *Echium angustifolium*. Η *Anchusa undulata* ssp. *hybrida* συλλέχθηκε σε περίοδο ανθοφορίας στις 16-19/04/2016, από τη νήσο Ικαρία και συγκεκριμένα από την περιοχή Κοσσίκια, και τα υπέργεια τμήματα σε άνθηση διαχωρίστηκαν από τις ρίζες του φυτού. Το *Echium plantagineum* συλλέχθηκε και αυτό σε περίοδο ανθοφορίας στις 16-19/04/2016, από την περιοχή της Δάφνης στην Ικαρία, και διαχωρίστηκαν τα υπέργεια τμήματα από τις ρίζες του φυτού. Ακολούθησε η ξήρανση των συλλεχθέντων υπέργειων τμημάτων σε χώρο καλά αεριζόμενο και σκοτεινό, ενώ οι ρίζες αφού τεμαχίστηκαν, αποθηκεύτηκαν στους -80 °C και εν συνεχεία λυοφιλοποιήθηκαν. Μετά την απομάκρυνση της υγρασίας, το ξηρό φυτικό υλικό κονιοποιήθηκε. Τα φυτικά υλικά εκχυλίστηκαν με τη χρήση υπερήχων χρησιμοποιώντας διαδοχικά διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας: διχλωρομεθάνιο (DCM), μεθανόλη (MeOH) και μεθανόλη:νερό 50:50 (MeOH:H₂O 50:50). Για κάθε σύστημα διαλυτών πραγματοποιήθηκαν 2 κύκλοι εκχύλισης, διάρκειας 30 λεπτών τη φορά, αποφεύγοντας τη θέρμανση του υλικού (σταθερή θερμοκρασία 20-25 °C). Στην περίπτωση παρασκευής υδραλκοολικών εκχυλισμάτων παρατάθηκε η διαβροχή του υλικού (δεύτερος κύκλος) για 12h προκειμένου να γίνει δυνατή η εξαντλητική παραλαβή των συστατικών. Οι διαλύτες εκχύλισης απομακρύνονταν κάθε φορά με τη χρήση Rotavapor ή λυοφιλοποίησης όπου υπήρχε νερό και τα ξηρά εκχυλίσματα αποθηκεύονταν σε σκουρόχρωμα φιαλίδια. Στην *Anchusa undulata* ssp. *hybrida* τα βάρη των κόνεων των ριζών και των υπέργειων τμημάτων που εκχυλίστηκαν ήταν 50 g, ενώ στην περίπτωση του *Echium plantagineum* η σκόνη των υπέργειων

τμημάτων ήταν 50 g και των ριζών 36 g. Οι αποδόσεις των εκχυλίσεων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 41. Αποδόσεις εκχυλίσεων ειδών της οικογένειας *Boraginaceae*

Φυτικό είδος	Φυτικό υλικό	Διαλύτης εκχύλισης	Κωδικός εκχυλίσματος	Βάρος εκχυλίσματος	Απόδοση εκχύλισης
<i>A. undulata ssp. hybrida</i>	ρίζα	DCM	AURA	0.3476g	0.69%
<i>A. undulata ssp. hybrida</i>	ρίζα	MeOH	AURB	3.1962g	6.35%
<i>A. undulata ssp. hybrida</i>	ρίζα	MeOH/H ₂ O 50/50	AURC	5.7914g	11.58%
<i>A. undulata ssp. hybrida</i>	υπέργεια	DCM	AUYA	0.6681g	1.32%
<i>A. undulata ssp. hybrida</i>	υπέργεια	MeOH	AUYB	1.8232g	3.65%
<i>A. undulata ssp. hybrida</i>	υπέργεια	MeOH/H ₂ O 50/50	AUYC	3.0972g	6.19%
<i>Echium plantagineum</i>	ρίζα	DCM	EPRA	0.2248g	0.45%
<i>Echium plantagineum</i>	ρίζα	MeOH	EPRB	1.0276g	2.85%
<i>Echium plantagineum</i>	ρίζα	MeOH/H ₂ O 50/50	EPRC	2.4162g	6.67%
<i>Echium plantagineum</i>	υπέργεια	DCM	EPYA	0.6788g	1.35%
<i>Echium plantagineum</i>	υπέργεια	MeOH	EPYB	1.7478g	3.48%
<i>Echium plantagineum</i>	υπέργεια	MeOH/H ₂ O 50/50	EPYC	3.3002g	6.57%

Το χημικό φορτίο όλων των παραληφθέντων εκχυλισμάτων ελέγχθηκε με υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας (LC-MS) (βλ. παράρτημα) και με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) όπως φαίνεται παρακάτω:



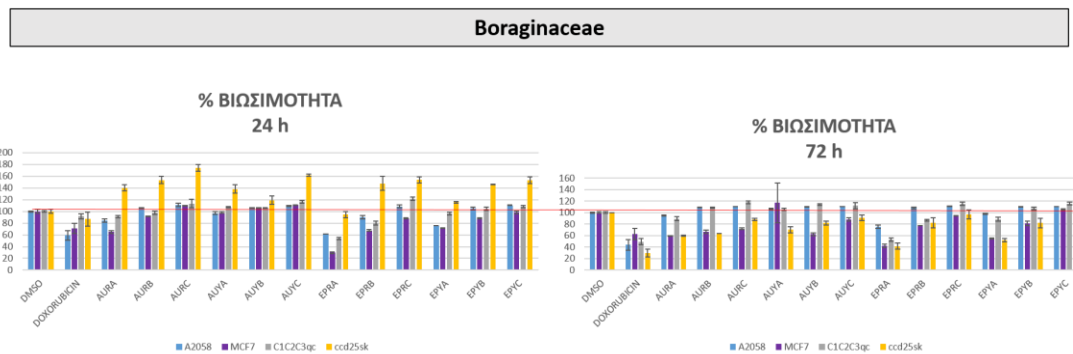
Εικόνα 112. Χρωματογραφήματα HPTLC των εκχυλισμάτων των ειδών της οικογένειας *Boraginaceae* σε συστήματα ανάπτυξης Toluene/EtOAc/FA 80/20/2, DCM/MeOH 95/5 για τα άπολα εκχυλίσματα και EtOAc/MeOH/ H₂O/FA 50/10/7/1 και DCM/MeOH/H₂O 70/30/4 για τα πολικά εκχυλίσματα. Επάνω: άπολα εκχυλίσματα Κάτω: πολικά εκχυλίσματα

11.3.2 Βιολογική αξιολόγηση ολικών εκχυλισμάτων

Όπως έχει αναφερθεί στη γενικότερη ενότητα της βιολογικής αξιολόγησης των εκχυλισμάτων, από τα εκχυλίσματα της οικογένειας *Boraginaceae* τα πολικά εκχυλίσματα ολόκληρου του φυτού του είδους *Anchusa caespitosa*, ACAWB, των ριζών και των υπέργειων τμημάτων του είδους *Anchusa undulata* ssp. *hybrida*, AURB, AURC, AUYB, AUYC, επέδειξαν $93.53 \pm 2.24\%$, $90.81 \pm 0.70\%$, $98.40 \pm 0.13\%$, $81.18 \pm 2.10\%$, $95.94 \pm 2.34\%$ αναστολή της AChE αντίστοιχα, ενώ μόνο το εκχύλισμα AURB εμφάνισε σημαντική αναστολή της AChE ($50.77 \pm 1.06\%$) και στη μέθοδο Ellman's. Το μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του *Echium angustifolium* (EAYB) και το υδατομεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του *Echium plantagineum* (EPYC) παρουσίασαν αναστολή της AChE με ποσοστά $66.49 \pm 2.05\%$ και $67.75 \pm$

0.14%, αντίστοιχα, ενώ ισχυρότερη δράση εμφάνισαν τα πολικά εκχυλίσματα των ριζών του *Echium plantagineum*, EPRB και EPRC, τα οποία ανέστειλαν την AChE κατά $90.23 \pm 1.64\%$ και $97.04 \pm 0.36\%$ (Μέθοδος NA-FBB). Σημειώνεται επίσης ότι τα διχλωρομεθανικά εκχυλίσματα των ριζών των ειδών *Anchusa undulata* ssp. *hybrida* και *Echium plantagineum* εμφάνισαν υψηλά ποσοστά αναστολής της AChE στη μέθοδο NA-FBB, $74.05 \pm 4.21\%$ και $68.21 \pm 0.04\%$, αντίστοιχα. Στη δοκιμασία αναστολής της υαλουρονιδάσης, σημαντικές δράσεις επέδειξαν τα πολικά εκχυλίσματα ολόκληρου του φυτού *Anchusa caespitosa* (ACAWB), των υπέργειων τμημάτων της *Anchusa undulata* ssp. *hybrida* (AUYB και AUYC), των ριζών του *Echium plantagineum* (EPRB και EPRC), με αντίστοιχα ποσοστά αναστολής $47.44 \pm 1.28\%$, $58.99 \pm 0.84\%$, $55.49 \pm 2.78\%$, $63.99 \pm 2.42\%$ και $95.17 \pm 0.39\%$. Με βάση τα προαναφερόμενα αποτελέσματα θα μπορούσε να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι στο γένος *Anchusa* η ανασταλτική επί της Hyal δράση εντοπίζεται στα υπέργεια τμήματα, ενώ στο γένος *Echium* στη ρίζα. Τέλος, στη δοκιμασία αναστολής της sPLA₂, τα μεθανολικά εκχυλίσματα των ειδών *Anchusa caespitosa* (ACAWB) και *Echium angustifolium* (EAYB) παρουσίασαν ικανοποιητική αναστολή του ενζύμου με αντίστοιχα ποσοστά $64.56 \pm 3.51\%$ και $81.69 \pm 3.21\%$.

Τα αποτελέσματα των ελέγχων κυτταροτοξικότητας παρουσιάζονται στο παρακάτω ραβδόγραμμα:



Εικόνα 113. Επίδραση των εκχυλισμάτων της οικογένειας Boraginaceae στη βιωσιμότητα των κυττάρων A2058, MCF7, C1C2C3qc και ccd25sk συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα, δηλαδή την ομάδα των κυττάρων που επώαστηκαν με 0,2% DMSO. Τα κύτταρα επώαστηκαν με τα εκχυλίσματα (συγκέντρωση 250μg/mL) για 24 και 72 ώρες προτού εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. Οι αριθμοί των κυττάρων παρουσιάζονται ως % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή \pm SEM. Ως πρότυπη ουσία χρησιμοποιήθηκε η δοξορουβικίνη.

Στις δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας ελέγχθηκαν τα εκχυλίσματα των ριζών και των υπέργειων τμημάτων των *Anchusa undulata* ssp. *hybrida* και *Echium plantagineum* της οικογένειας Boraginaceae. Μεταξύ των εκχυλισμάτων της *Anchusa* μόνο το διχλωρομεθανικό

εκχύλισμα των ριζών (AURA) παρουσίασε κυτταροτοξική δράση έναντι των MCF-7 κυττάρων, ελαφρώς ισχυρότερη από τη δοξορουβικίνη, τόσο στις 24 όσο και στις 72 ώρες επώασης, χωρίς τοξικότητα στη φυσιολογική σειρά κυττάρων. Τα εκχυλίσματα του *Echium* επέδειξαν ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση στα καρκινικά κύτταρα, διατηρώντας χαμηλή την τοξικότητα στα φυσιολογικά. Συγκεκριμένα, στις 24 ώρες, το διχλωρομεθανικό εκχύλισμα των ριζών του είδους (EPRA) προκάλεσε την ισχυρότερη αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα MCF-7 και C1C2C3qc, ακολουθούμενο από το μεθανολικό εκχύλισμα των ριζών (EPRB), το οποίο ήταν πιο τοξικό στις ίδιες σειρές συγκριτικά με τη δοξορουβικίνη στη συγκέντρωση που ελέγχθηκε και το διχλωρομεθανικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων (EPYA) το οποίο ήταν ελαφρώς πιο τοξικό στα MCF-7 συγκριτικά με τη δοξορουβικίνη στη συγκέντρωση που αξιολογήθηκε. Στις 72 ώρες περισσότερο δραστικά από τη δοξορουβικίνη ήταν μόνο τα AURA, EPRA και EPYA στη σειρά MCF-7.

11.3.3 Κλασμάτωση μεθανολικού εκχυλίσματος AURB με φυγόκεντρο χρωματογραφία κατανομής (FCPC)

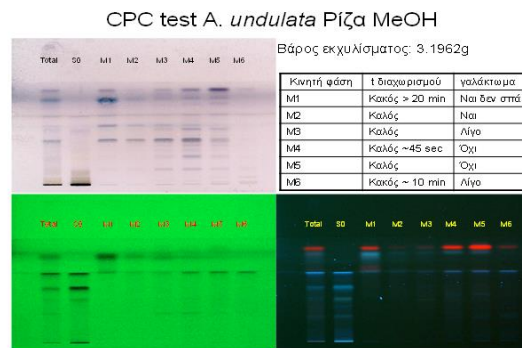
Μεταξύ των εκχυλισμάτων της οικογένειας Boraginaceae, το μεθανολικό εκχύλισμα των ριζών του είδους *Anchusa undulata* ssp. *hybrida* (Κωδικός εκχυλίσματος: AURB) ήταν αυτό που μελετήθηκε φυτοχημικά και φαρμακολογικά καθώς οι βιβλιογραφικές αναφορές που αφορούν το είδος είναι περιορισμένες σε αριθμό, παρουσιάζει ενδιαφέρον φυτοχημικό προφίλ και ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι της ακετυλοχολινεστεράσης.

Επιλογή συστήματος:

Προκειμένου να επιλεγεί το καταλληλότερο σύστημα έκλουσης για τη φυγόκεντρο χρωματογραφία κατανομής του AURB πραγματοποιήθηκαν οι εξής δοκιμές:

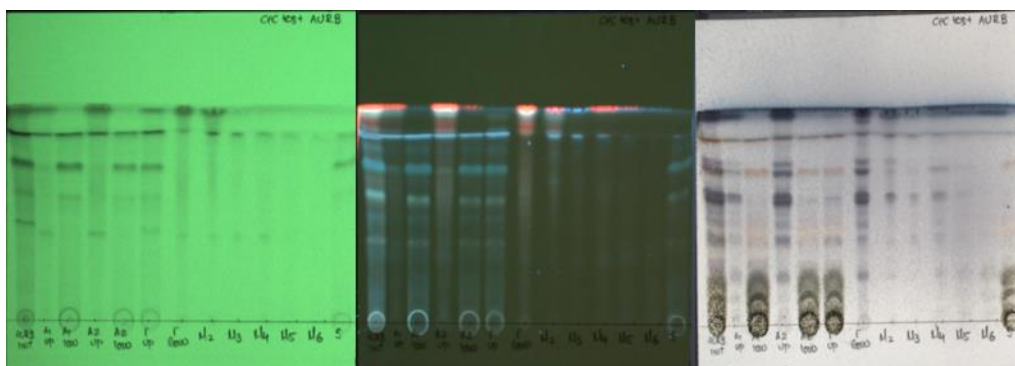
- ο Συνδυασμός συστημάτων Oka¹⁴³ τα οποία περιέχουν 5 διαλύτες (επτάνιο (Heptane), οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc), βουτανόλη (BuOH), μεθανόλη (MeOH), νερό (H₂O)), όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.

	Heptane	EtOAc	BuOH	MeOH	H ₂ O
S1	2.0	4.0	0.0	1.0	5.0
S2	1.0	5.0	0.0	1.0	5.0
S3	1.0	4.5	0.5	1.0	5.0
S4	0.5	4.0	1.5	1.0	5.0
S5	0.5	3.0	2.5	1.0	5.0
S6	0.5	2.0	4.5	1.0	5.0



Εικόνα 114. Αριστερά: Πίνακας συστημάτων έκλουσης πρώτης δοκιμής και Δεξιά: TLC κατανομή συστατικών και σχόλια της προσομοίωσης της χρήσης των αναφερόμενων συστημάτων στην FCPC κλασμάτωση του εκχυλίσματος AURB (Total: αρχικό εκχύλισμα, S0: Στατική (κάτω) φάση, M1: κινητή φάση 1^{ου} συστήματος, M2: κινητή φάση 2^{ου} συστήματος, M3: κινητή φάση 3^{ου} συστήματος, M4: κινητή φάση 4^{ου} συστήματος, M5: κινητή φάση 5^{ου} συστήματος, M6: κινητή φάση 6^{ου} συστήματος. Σύστημα ανάπτυξης: EtOAc/MeOH/H₂O/FA 50/10/7/1

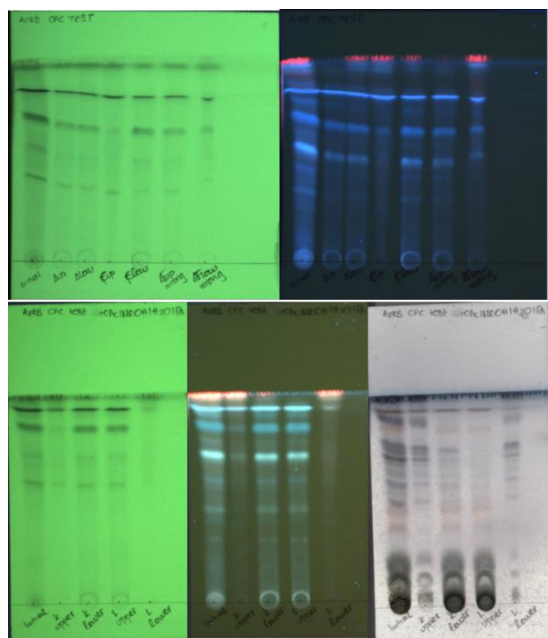
- Εν συνεχεία δοκιμάστηκαν 3 ισοκρατικά συστήματα 1) N-Butanol:MTBE:ACN:H₂O 3:1:1:5, το οποίο προκάλεσε γρήγορο διαχωρισμό των φάσεων, ένα ελαφρύ γαλάκτωμα αρχικά και ratio 1:1 μεταξύ των φάσεων (System A1), 2) N-Butanol:MTBE:ACN:H₂O 2:2:1:5, το οποίο προκάλεσε καθυστερημένο διαχωρισμό, γαλάκτωμα που σπάει δύσκολα αλλά ratio 1:1 (System A2) και 3) CHCl₃:MeOH:H₂O 7:13:8 το οποίο προκάλεσε γρήγορο διαχωρισμό, ελαφρύ γαλάκτωμα και ratio 1 (lower):3 (upper) (System Γ). Επιπλέον δοκιμάστηκε ξανά το αρχικό βαθμιδωτό σύστημα ξεκινώντας αυτή τη φορά από το 2^ο σύστημα με την εξής αλληλουχία: M2/M3/M4/M5/M6/S (extrusion), το οποίο προκάλεσε πολύ γαλάκτωμα στο M2 που σπάει πιο εύκολα στο M5, ενώ το M6 δεν έχει καλή εικόνα. Οι εικόνες TLC διαχωρισμού των συστατικών με αυτές τις δοκιμές φαίνονται παρακάτω.



Εικόνα 115. TLC κατανομή συστατικών με χρήση 2^{ου}, 3^{ου}, 4^{ου} και 5^{ου} δοκιμαστικού συστήματος για την FCPC κλασμάτωση του εκχυλίσματος AURB

- Τέλος δοκιμάστηκαν επιπλέον 4 ισοκρατικά συστήματα τα οποία είναι 6) DCM:MeOH:H₂O 7:13:8, το οποίο προκάλεσε καλύτερο διαχωρισμό από το αντίστοιχο

με το χλωροφόρμιο (System Δ), 7)EtOAc:N-Butanol:H₂O 3:2:5 που προκάλεσε γαλάκτωμα που σπάει δύσκολα (System F), 8)EtOAc:MeOH:H₂O 5:3:5 που προκάλεσε σχετικά αργό διαχωρισμό φάσεων αλλά ελάχιστο γαλάκτωμα και ratio 1(upper):3(lower)) (System K) και 9)CHCl₃:MeOH:H₂O 4:3:2 που προκάλεσε γρήγορο διαχωρισμό, περισσότερο γαλάκτωμα, ratio 1:1 (System L). Οι TLC των δοκιμασιών αυτών φαίνονται παρακάτω.



Εικόνα 116. TLC κατανομής συστατικών με χρήση 6^{ου}, 7^{ου}, 8^{ου} και 9^{ου} δοκιμαστικού συστήματος για την FCPC κλασμάτωση του εκχυλίσματος AURB

Τελικά έγινε επιλογή του ισοκρατικού συστήματος K για την αποτελεσματικότερη κλασμάτωση του εκχυλίσματος AURB.

Πειραματική διαδικασία:

Ποσότητα 2.86 g του μεθανολικού εκχυλίσματος AURB κλασματώθηκε με διαδικασία ισοκρατικής έκλουσης-εξώθησης με χρήση του παραπάνω συστήματος K (EtOAc:MeOH:H₂O 5:3:5). Οι συνθήκες του πειράματος φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 42. Συνθήκες FCPC κλασμάτωσης του εκχυλίσματος AURB

Βάρος εκχυλίσματος	2.86 g
Διαλύτες	EtOAc/MeOH/H ₂ O (5:3:5)

Στροφές	700 rpm
Ροή	4 ml/min
Κινητή φάση	πάνω φάση (οργανική)
Στατική φάση	κάτω φάση (υδατική)
Αλλαγή φάσεων	κλάσμα 70
Ρύθμιση	Ascending

Χρησιμοποιήθηκε στήλη 1000 mL. Το εκχύλισμα διαλύθηκε σε μείγμα ~3:1 στατικής (κάτω):κινητής (πάνω) φάσης (χρησιμοποιήθηκε Isoor 30 mL). Συλλέχθηκαν 126 κλάσματα όγκου 20 mL το καθένα, τα οποία συνενώθηκαν σε 46 με βάση το χημικό τους φορτίο μετά τον έλεγχο με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας.

Πίνακας 43. Συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν από την FCPC κλασμάτωση του εκχυλίσματος AURB

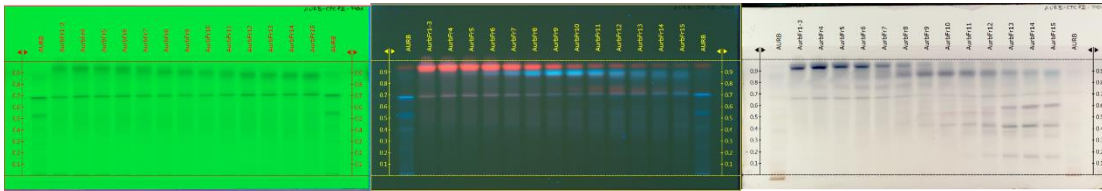
ΚΩΔΙΚΟΣ CPC ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΒΑΡΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ (mg)
AURB FR 1-3	5.0
AURB FR 4	2.5
AURB FR 5	3.3
AURB FR 6	4.1
AURB FR 7	5.1
AURB FR 8	6.8
AURB FR 9	7.3
AURB FR 10	8.6
AURB FR 11	6.8
AURB FR 12	5.9
AURB FR 13	6.4
AURB FR 14	6.5
AURB FR 15	5.8
AURB FR 16	7.9
AURB FR 17	18.3
AURB FR 18	18.0
AURB FR 19	13.1
AURB FR 20	11.6

AURB FR 21	14.7
AURB FR 22	17.0
AURB FR 23	13.5
AURB FR 24	10.9
AURB FR 25	8.4
AURB FR 26	7.4
AURB FR 27	7.4
AURB FR 28-29	14.2
AURB FR 30-31	14.2
AURB FR 32-33	10.2
AURB FR 34-40	32.0
AURB FR 41-46	21.8
AURB FR 47-53	20.3
AURB FR 54-60	16.4
AURB FR 61-63	7.1
AURB FR 64-66	7.5
AURB FR 67-69	7.5
AURB FR 70-75	26.9
AURB FR 76	5.2
AURB FR 77-78	7.9
AURB FR 79-82	13.9
AURB FR 83-85	23.0
AURB FR 86-94	178.1
AURB FR 95-105	182.0
AURB FR 106-111	405.3
AURB FR 112-114	342.3
AURB FR 115-125	1065.4
AURB FR WASTE	7.5

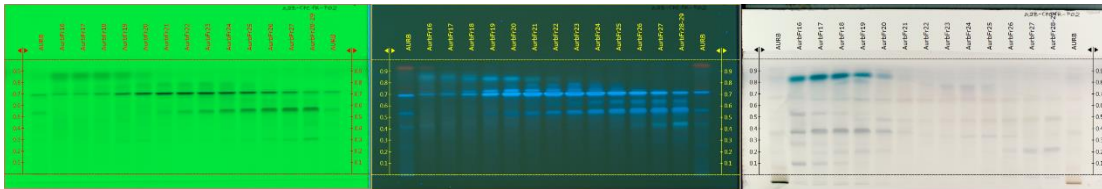
11.3.4 Έλεγχος χημικού φορτίου FCPC κλασμάτων με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC)

Για τον ποιοτικό έλεγχο των συνενωμένων FCPC κλασμάτων που προέκυψαν από το εκχύλισμα AURB χρησιμοποιήθηκε η τεχνική HPTLC. Τα συστήματα ανάπτυξης, οι συγκεντρώσεις και οι όγκοι των κλασμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην HPTLC ανάλυση προέκυψαν μετά από δοκιμές και αναλύονται ακολούθως.

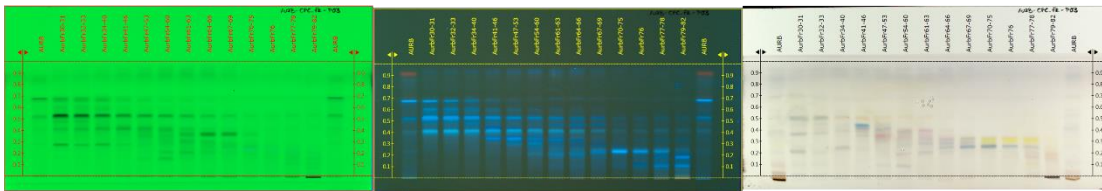
Σε κάθε πλάκα έγινε απόθεση 15 μL από κάθε διάλυμα κλάσματος (μετά από συνένωση) συγκέντρωσης 1 mg/mL στον κατάλληλο διαλύτη ή μείγμα διαλυτών. Τα συστήματα ανάπτυξης των πλακών επιλέχθηκαν με τρόπο τέτοιο ώστε να είναι δυνατή η παρατήρηση του μεγαλύτερου ποσοστού των μεταβολιτών που περιέχονται στο εκάστοτε κλάσμα. Οι ανεπτυγμένες πλάκες παρατηρήθηκαν και φωτογραφήθηκαν στα μήκη κύματος 254 και 366 nm , ενώ μετά τη σάρωση των χρωματογραφημάτων και τη λήψη των φασμάτων απορρόφησης στα μήκη κύματος 200, 254, 280 και 366 nm , πραγματοποιήθηκε η εμβάπτιση των πλακών σε διάλυμα θειικής βανιλίνης. Παρακάτω παρουσιάζονται οι πλάκες TLC των κλασμάτων.



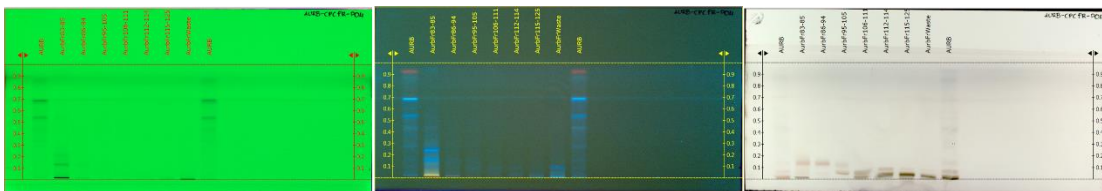
Εικόνα 117. AURB-P01 (EtOAc:MeOH:H₂O:FA 50:10:7:1)-Κλάσματα 1-15



Εικόνα 118. AURB-P02 (EtOAc:MeOH:H₂O:FA 50:10:7:1)-Κλάσματα 16-29



Εικόνα 119. AURB-P03 (EtOAc:MeOH:H₂O:FA 50:10:7:1)-Κλάσματα 30-82

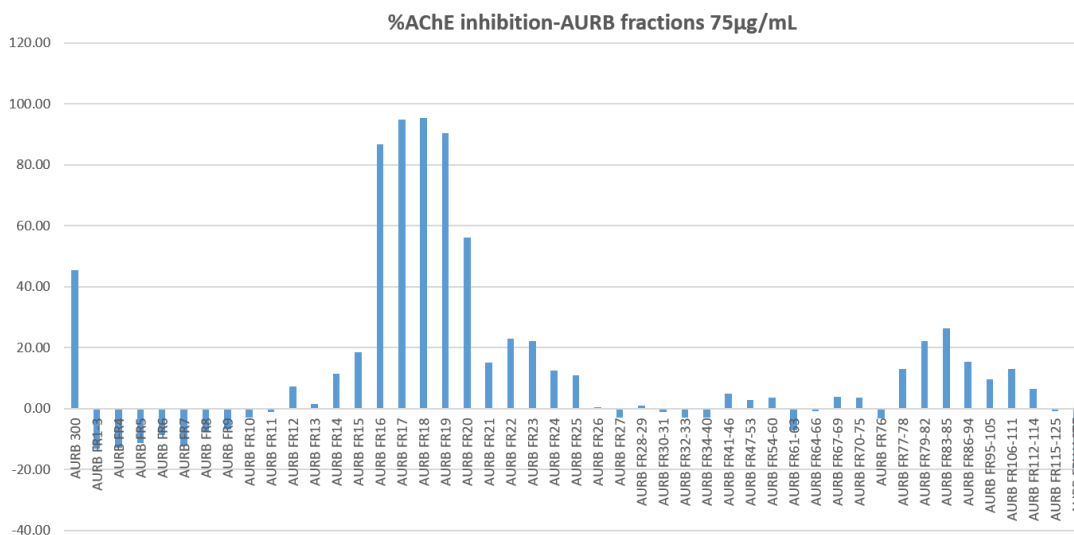


Εικόνα 120. AURB-P04 (EtOAc:MeOH:H₂O:FA 50:10:7:1)-Κλάσματα 83-WASTE

11.3.5 Βιολογική αξιολόγηση των FCPC κλασμάτων

○ *In vitro* έλεγχος ικανότητας αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης (Μέθοδος Ellman's)

Το εκχύλισμα AURB ελέγχθηκε στα 300 µg/mL και τα κλάσματα που προέκυψαν από την επεξεργασία του με την τεχνική FCPC στα 75 µg/mL, ως προς την ικανότητα αναστολής της AChE. Ως πρότυπος αναστολέας χρησιμοποιήθηκε η ουσία γαλανταμίνη σε συγκέντρωση 1.36 µM, η οποία προκαλεί αναστολή της AChE σε ποσοστό $40.00 \pm 1.1\%$. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα.



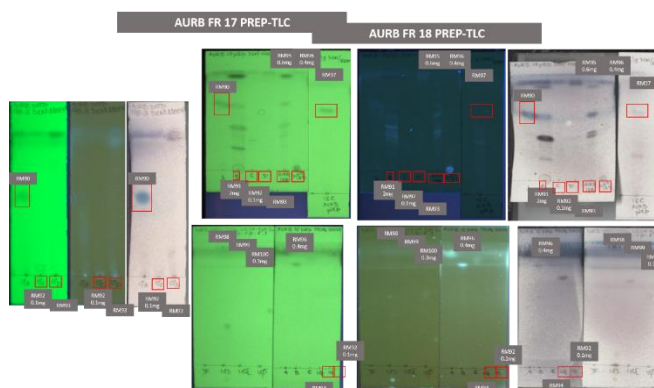
Εικόνα 121. Ραβδόγραμμα %αναστολής της AChE του εκχυλίσματος AURB (μεθανολικό εκχύλισμα ριζών της *Anchusa undulata* ssp. *hybrida*) σε συγκέντρωση 300 µg/mL και των FCPC κλασμάτων του σε συγκέντρωση 75 µg/mL. Η γαλανταμίνη χρησιμοποιήθηκε ως γνωστός πρότυπος αναστολέας της AChE σε συγκέντρωση 1.36 µM. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως η μέση τιμή τριών επαναλήψεων της μέτρησης του δείγματος.

Το αρχικό εκχύλισμα AURB προκαλεί $45.32 \pm 0.81\%$ αναστολή της AChE, στα 300 µg/mL. Όπως έχει αναφερθεί στην παράγραφο της βιολογικής αξιολόγησης των ολικών εκχυλισμάτων της οικογένειας Boraginaceae, το εκχύλισμα AURB αποτελεί το μόνο δραστικό στη δοκιμασία Ellman's, κάτι που επιβεβαιώνεται βιβλιογραφικά²⁵¹, και για το λόγο αυτό κλασματώθηκε. Η

βιολογική αξιολόγηση των FCPC κλασμάτων στα 75 µg/mL ανέδειξε την ισχυρή ανασταλτική δράση των κλασμάτων AURB FR.16 (86.95±1.55%), AURB FR.17 (94.80±0.97%), AURB FR.18 (95.38±0.52%), AURB FR.19 (90.28±1.84%) και AURB FR.20 (56.12±1.39%) και τη μέτρια ανασταλτική δράση των κλασμάτων AURB FR.77-78 (12.89±1.36%), AURB FR.79-82 (22.24±1.23%), AURB FR.83-85 (26.41±0.95%) και AURB FR.86-94 (15.29±1.64%).

11.3.6 Απομόνωση και ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών

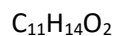
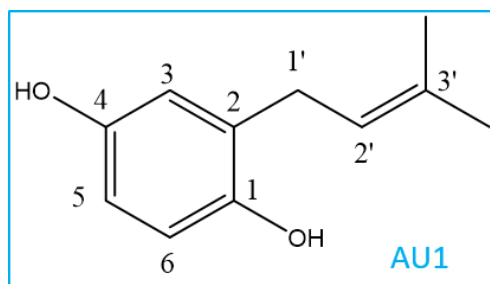
PREP-TLC στα κλάσματα AURB FR.17 και AURB FR.18:



AURB FR.17: 11.1 mg διαλύθηκαν σε EtOAc:MeOH 80:20, εναποτέθηκαν σε γυάλινη πλάκα PREP-TLC 12*20 cm, αναπτύχθηκαν στο σύστημα DCM:MeOH 92:8 και οι ζώνες που παραλήφθηκαν εκχυλίστηκαν με διάφορες αναλογίες EtOAc/MeOH και DCM/MeOH. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για το κλάσμα AURB FR.18 (10.6 mg).

Στο κλάσμα RM91 (2 mg) παραλήφθηκε η 2-(3-μεθυλοβουτ-2-ενυλο)βενζενο-1,4-διολη (**AU1**).

Ο μεταβολίτης **AU1** ταυτοποιήθηκε ως η 2-(3-μεθυλοβουτ-2-ενυλο)βενζενο-1,4-διολη (MW=178.231 g/mol) με τη λήψη φασμάτων ¹H-NMR, COSY, HSQC-DEPT, HMBC σε διαλύτη CDCl₃ και σύγκριση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα²⁵².



Θέση	$^1\text{H-NMR}$ [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]	$^{13}\text{C-NMR}$ (ppm)
1	-	148.33
2	-	128.13
3	6.60 (1H, d, $J = 3.0$ Hz)	117.22
4	-	149.14
5	6.58 (1H, dd, $J = 8.5/3.0$ Hz)	114.17
6	6.68 (1H, d, $J = 8.5$ Hz)	116.86
1'	3.29 (2H, d, $J = 7.1$ Hz)	30.07
2'	5.29 (1H, t, $J = 7.1$ Hz)	121.87
3'	-	133.50
CH₃-3'	1.76, 1.77 (3H, s)	25.99, 18.39
OH	4.35, 4.68 (1H, brs)	-

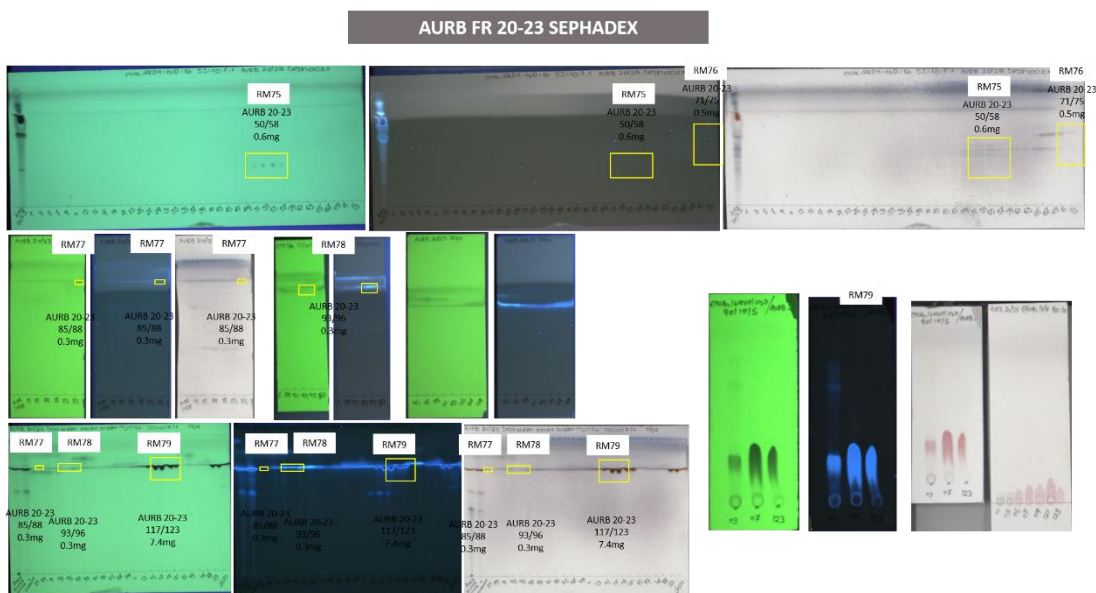
Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ παρατηρείται ένα ABX σύστημα με τα πρωτόνια των θέσεων 3, 6 και 5 να εμφανίζονται ως δύο διπλές ($J = 3.0$ και 8.5 Hz) και μια διπλή διπλών ($J = 8.5/3.0$ Hz), στα 6.60, 6.68 και 6.58 ppm, αντίστοιχα. Τα σήματα των ανθράκων των θέσεων 3, 6 και 5 εμφανίζονται στα 117.22, 116.86 και 114.17 ppm. Στην περιοχή των διπλών δεσμών, εμφανίζεται χαρακτηριστική τριπλή κορυφή $J = 7.1$ Hz που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο 2' της πρενυλομάδας, ενώ το σήμα του άνθρακα εντοπίζεται στα 121.87 ppm. Επίσης υπάρχουν μια διπλή κορυφή στα 3.29 ppm με $J = 7.1$ Hz, η οποία ολοκληρώνει για 2 πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια της θέσης 1' της πρενυλομάδας και δύο απλές κορυφές στα 1.77 ppm και 1.76 ppm που καθεμία ολοκληρώνει για 3 πρωτόνια και αντιστοιχούν στα δύο μεθύλια της πρενυλομάδας. Τέλος, στα 4.68 ppm και στα 4.35 ppm παρατηρούνται οι ευρείες απλές κορυφές

των υδροξυλομάδων. Η θέση των υποκαταστατών επιβεβαιώθηκε μέσω του HMBC όπου γίνεται φανερό το σήμα σύζευξης του πρωτονίου της θέσης 3 με τον άνθρακα 1' της πρενυλομάδας.

Ο μεταβολίτης αυτός ονομάζεται πρενυλοϋδροκινόνη. Απομονώνεται πρώτη φορά από το γένος *Anchusa*. Αποτελεί σπάνιο δευτερογενή μεταβολίτη και υπάρχει μόνο μια αναφορά για την απομόνωση της ουσίας από τη ρίζα της *Ehretia longiflora* (Boraginaceae)²⁵³ (μεθανολικό εκχύλισμα) και 2 αναφορές για την παραλαβή της από το θαλάσσιους οργανισμούς του γένους *Aplidium* sp.²⁵⁴ όπως το *Aplidium californicum*. Έχει επιδείξει *in vitro* και *in vivo* αντιφλεγμονώδη δράση μέσω μείωσης της παραγωγής του παράγοντα TNFα και της αναστολής της απελευθέρωσης PGE₂²⁵⁵. Η αντινεοπλασματική του δράση έχει αποδειχθεί σε δοκιμασία αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά P388 λευχαιμίας²⁵⁶. Εμφανίζει ικανότητα αναστολής του *Mycobacterium tuberculosis* και αντιοξειδωτική δράση καθώς αναστέλλει την παραγωγή ανιόντων υπεροξειδίου στο σύστημα ξανθίνης/ξανθινοξειδάσης.

Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού (Sephadex):

Κλάσμα AURB FR.20-23: 32.5 mg του κλάσματος υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με στατική φάση sephadex LH-20 και κινητή φάση MeOH:EtOAc 80:20.



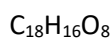
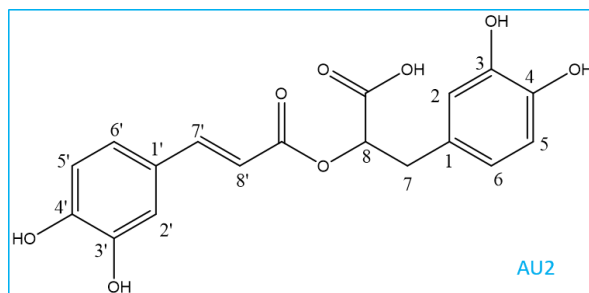
Εικόνα 122. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας των κλασμάτων της sephadex στο κλάσμα AURB FR.20-23. Σύστημα ανάπτυξης EtOAc/MeOH/H₂O/Formic acid 55/10/7/1

Συνολικά παρελήφθησαν 123 κλάσματα, όγκου 500 μL το καθένα, από τα οποία 5 συνενωμένα κλάσματα ελέγχθησαν για το χημικό τους φορτίο με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

Κωδικός κλάσματος	Κωδικός NMR	Βάρος δείγματος (mg)
AURB 20-23 50/58	RM75	0.6
AURB 20-23 71/75	RM76	0.5
AURB 20-23 85/88	RM77	0.3
AURB 20-23 93/96	RM78	0.3
AURB 20-23 117/123	RM79	7.4

Στο κλάσμα RM79 παραλήφθηκε το ροσμαρινικό οξύ (AU2).

Ο μεταβολίτης AU2 ταυτοποιήθηκε ως το ροσμαρινικό οξύ (MW= 360.318 g/mol) με τη λήψη ¹H-NMR φάσματος σε διαλύτη MeOD και σύγκριση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα²⁴⁶.



Πίνακας 44. Φασματοσκοπικά δεδομένα του ροσμαρινικού οξέος (MeOD, 400 MHz)

Θέση	¹ H-NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]	
1	-	
2	6.77 (1H, d, J = 1.9 Hz)	
3	-	
4	-	
5	6.71 (1H, d, J = 8.3 Hz)	
6	6.63 (1H, dd, J = 8.3/1.9 Hz)	
7	(a) 3.12 (1H, dd, J = 14.2/4.0 Hz)	(b) 3.02 (1H, dd, J = 14.2/8.3 Hz)

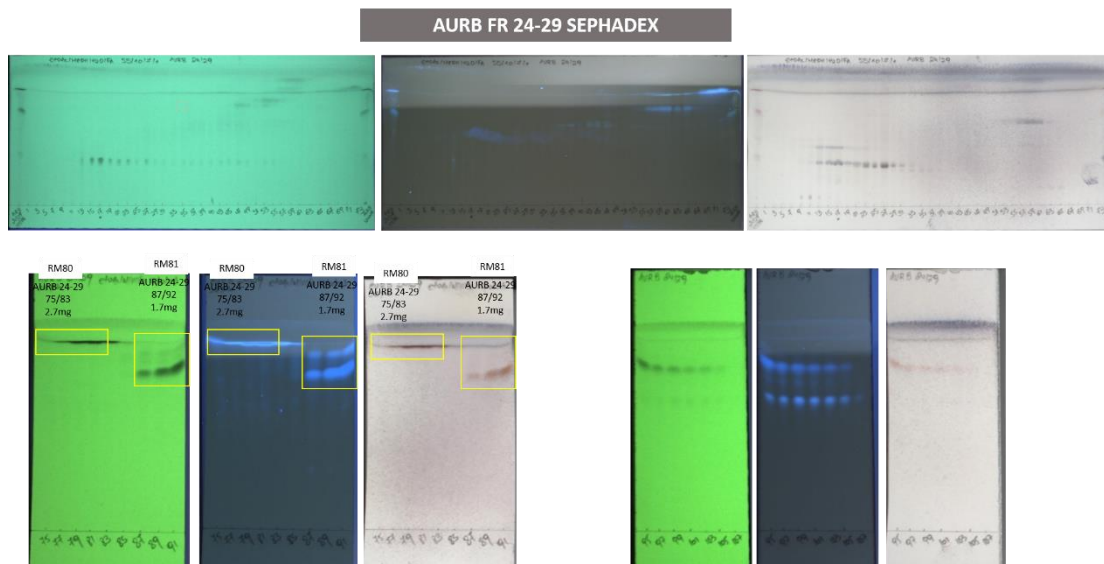
8	5.20 (1H, dd, $J = 8.3/4.0$ Hz)
1'	-
2'	7.06 (1H, d, $J = 1.9$ Hz)
3'	-
4'	-
5'	6.80 (1H, d, $J = 8.3$ Hz)
6'	6.97 (1H, dd, $J = 8.3/1.9$ Hz)
7'	7.56 (1H, d, $J = 16.0$ Hz)
8'	6.28 (1H, d, $J = 16.0$ Hz)

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ παρατηρούνται οι κορυφές δύο ABX συστημάτων 7.06-6.63 ppm, ένας *trans*-διπλός δεσμός στα 7.56 ppm και στα 6.28 ppm και οι τρεις διπλές διπλών κορυφές αλειφατικών πρωτονίων, εκ των οποίων η μια είναι στην ξυγνωνωμένη περιοχή (δ 5.20) και οι άλλες δύο σε υψηλότερα πεδία συντονισμού (δ 3.12 και 3.02).

Το ροσμαρινικό οξύ έχει απομονωθεί ξανά από το συγκεκριμένο φυτικό είδος²³⁶ και γενικότερα αποτελεί έναν κοινό μεταβολίτη του φυτικού βασιλείου. Είναι εστέρας του καφεϊκού οξέος και του 3,4-διϋδροξυφαινυλολακτικού οξέος, ανήκει στην κατηγορία των φυτικών φαινυλοπροπανοϊδών και απαντάται σε είδη της οικογένειας Boraginaceae, της υποοικογένειας Nepetoideae της οικογένειας Lamiaceae, αλλά και σε κατώτερους φυτικούς οργανισμούς όπως είναι οι φτέρες. Απομονώθηκε πρώτη φορά το 1958 από το είδος *Rosmarinus officinalis* από τους Scarpati και Oriente, οι οποίοι ονόμασαν την ουσία με βάση το φυτό από το οποίο απομονώθηκε. Η βιοσύνθεση του ροσμαρινικού οξέος έχει μελετηθεί εκτενώς και δημοσιεύθηκε πρώτη φορά το 1970 όπου διευκρινίστηκε ότι τα δύο αρωματικά αμινοξέα, L-τυροσίνη και L-φαινυλανανίνη, αποτελούν τα δομικά μόρια του ροσμαρινικού οξέος. Έχει επιδείξει πλήθος βιολογικών δράσεων *in vitro* και *in vivo*, γεγονός που το καθιστά ενδιαφέρον συστατικό για τη βιομηχανία φαρμάκων, τροφίμων και καλλυντικών. Έχει εμφανίσει κυτταροτοξική (κυτταρικές σειρές στήθους, ήπατος, προστάτη, πνεύμονα και λευχαιμίας), καρδιοπροστατευτική, αντιοξειδωτική, αντιαιμορραγική, ηπατοπροστατευτική, αντιμικροβιακή, διουρητική, αντιδιαβητική και αντιφλεγμονώδη δράση²⁵⁹. Έχει παρουσιάσει ικανοποιητική αναστολή ενζύμων όπως η τυροσινάση και η ακετυλοχολινεστεράση²⁶⁰.

Κλάσμα AURB FR.24-29: 22.2 mg του κλάσματος υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία

μοριακού αποκλεισμού με στατική φάση sephadex LH-20 και κινητή φάση MeOH:EtOAc 50:50.



Εικόνα 123. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας των κλασμάτων της sephadex στο κλάσμα AURB FR.24-29. Σύστημα ανάπτυξης EtOAc/MeOH/H₂O/Formic acid 55/10/7/1

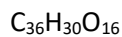
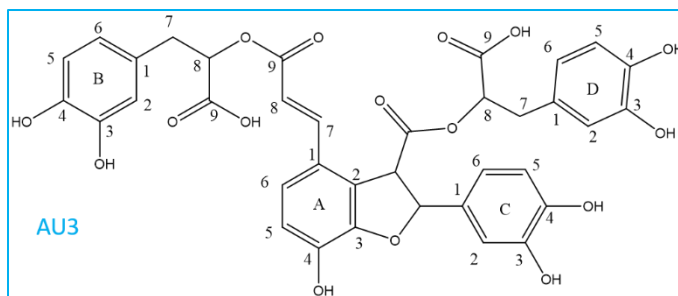
Συνολικά παρελήφθησαν 107 κλάσματα, όγκου 500 μL το καθένα, από τα οποία 2 συνενωμένα κλάσματα ελέγχθησαν για το χημικό τους φορτίο με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

Κωδικός κλάσματος	Κωδικός NMR	Βάρος δείγματος (mg)
AURB 24-29 75/83	RM80	2.7
AURB 24-29 87/92	RM81	1.7

Στο κλάσμα RM80 παραλήφθηκε το ροσμαρινικό οξύ (AU2).

Στο κλάσμα RM81 παραλήφθηκε ένα παράγωγο ροσμαρινικού οξέος, το σαλβιανολικό οξύ B (AU3).

Ο μεταβολίτης AU3 ταυτοποιήθηκε ως το σαλβιανολικό οξύ B (MW=718.61 g/mol) με τη λήψη ¹H-NMR φάσματος σε διαλύτη MeOD και σύγκριση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα²⁵⁸.



Πίνακας 45. Φασματοσκοπικά δεδομένα του σαλβιανολικού οξέος Β (MeOD, 400 MHz)

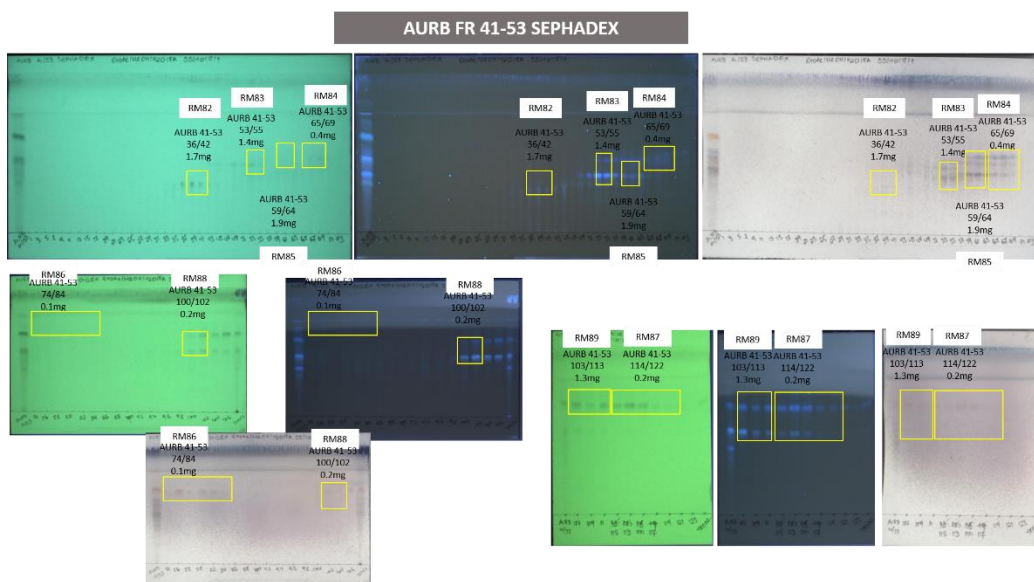
Θέση	$^1\text{H-NMR}$ [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]
A5	6.87 (1H, d, $J = 8.2$ Hz)
A6	7.20 (1H, d, $J = 8.2$ Hz)
A7	7.50 (1H, d, $J = 15.9$ Hz)
A8	6.30 (1H, d, $J = 15.9$ Hz)
B2	6.70 (1H, d, $J = 1.5$ Hz)
B5	6.65 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)
B6	6.54 (1H, dd, $J = 8.0/1.5$ Hz)
B7α/ B7β	3.05 (4H, m)
B8	5.21 (1H, brs)
C2	6.82 (1H, d, $J = 1.9$ Hz)
C5	6.80 (1H, d, $J = 8.2$ Hz)
C6	6.83 (1H, dd, $J = 8.2/1.9$ Hz)
C7	5.87 (1H, d, $J = 5.1$ Hz)
C8	4.35 (1H, d, $J = 5.1$ Hz)
D2	6.71 (1H, d, $J = 1.9$ Hz)
D5	6.74 (1H, d, $J = 8.2$ Hz)
D6	6.70 (1H, dd, $J = 8.2/1.9$ Hz)
D7α/ D7β	3.05 (4H, m)
D8	5.22 (1H, brs)

Ο μεταβολίτης είναι παράγωγο του ροσμαρινικού οξέος και για το λόγο αυτό τα

φάσματα των δύο ουσιών είναι πανομοιότυπα όσον αφορά το δακτύλιο B, ενώ στο δακτύλιο A δεν υπάρχει πλέον η τρις- υποκατάσταση. Ο C δακτύλιος είναι ένα ABX σύστημα και τα πρωτόνια του δακτυλίου με τον οποίο συνδέεται εμφανίζονται στα 5.87 ppm και 4.35 ppm (C7, C8) ως διπλές κορυφές με $J = 5.1$ Hz, με περισσότερο αποθωρακισμένο το πρωτόνιο που συνδέεται με το οξυγόνο. Οι κορυφές του δακτυλίου D είναι όμοιες με αυτές του δακτυλίου B.

Το σαλβιανολικό οξύ B παραλαμβάνεται πρώτη φορά από το γένος *Anchusa*. Έχει απομονωθεί από την οικογένεια Boraginaceae, και συγκεκριμένα από το γένος *Lithospermum*, αλλά και από τη *S. miltiorrhiza*, της οποίας είναι χαρακτηριστικός μεταβολίτης. Έχει εμφανίσει σημαντική αντιοξειδωτική, αντι-HIV, κυτταροτοξική δράση αλλά και νευροπροστατευτική, προστατευτική σε περιπτώσεις καρδιακών και εγκεφαλικών ισχαιμικών επεισοδίων²⁵⁸.

Κλάσμα AURB FR.41-53: 29.3 mg του κλάσματος υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με στατική φάση sephadex LH-20 και κινητή φάση MeOH:EtOAc 80:20.



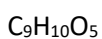
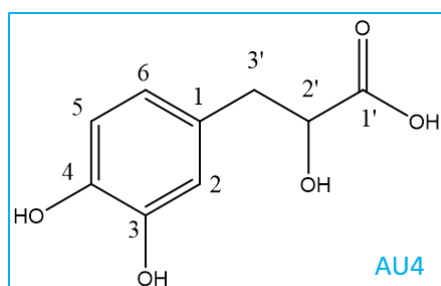
Εικόνα 124. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας των κλασμάτων της sephadex στο κλάσμα AURB FR.41-53. Σύστημα ανάπτυξης EtOAc/MeOH/H₂O/Formic acid 55/10/7/1

Συνολικά παρελήφθησαν 123 κλάσματα, όγκου 500 μL το καθένα, από τα οποία 8 συνενωμένα κλάσματα ελέγχθησαν για το χημικό τους φορτίο με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

Κωδικός κλάσματος	Κωδικός NMR	Βάρος δείγματος (mg)
AURB 41-53 36/42	RM82	1.7
AURB 41-53 53/55	RM83	1.4
AURB 41-53 65/69	RM84	0.4
AURB 41-53 59/64	RM85	1.9
AURB 41-53 74/84	RM86	0.1
AURB 41-53 114/122	RM87	0.2
AURB 41-53 100/102	RM88	0.2
AURB 41-53 103/113	RM89	1.3

Στο κλάσμα RM86 παραλήφθηκε το 3-(3,4-διϋδροξυφαινυλο)λακτικό οξύ (AU4).

Ο μεταβολίτης AU4 ταυτοποιήθηκε ως το 3-(3,4-διϋδροξυφαινυλο)λακτικό οξύ (danshensu) (MW=198.17 g/mol) με τη λήψη ¹H-NMR φάσματος σε διαλύτη MeOD και σύγκριση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα²⁶¹.



Πίνακας 46. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 3-(3,4-διϋδροξυφαινυλο)λακτικού οξέος (MeOD, 400 MHz)

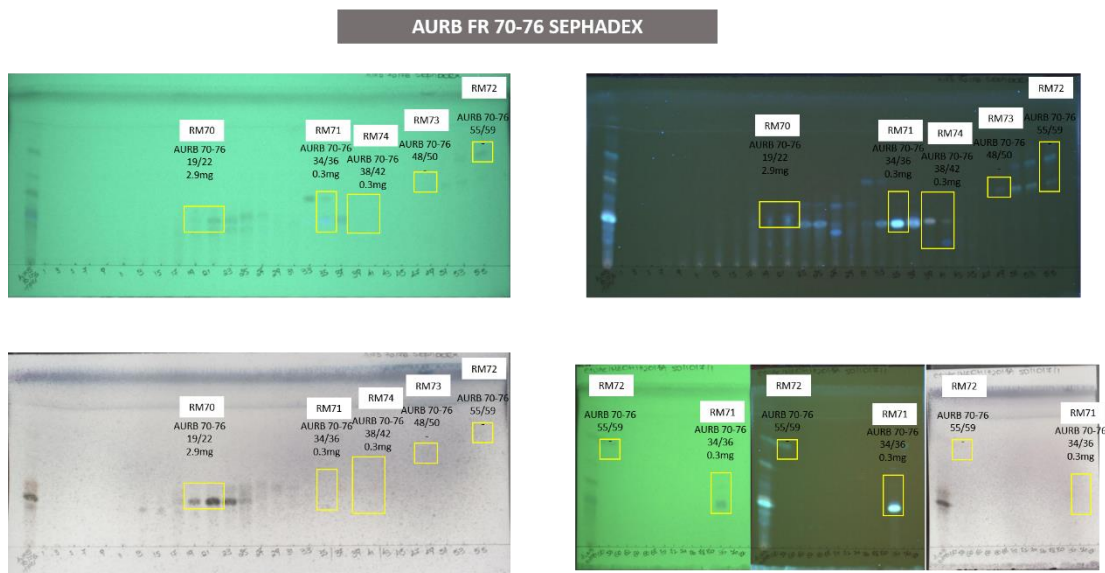
Θέση	¹ H-NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]
1	-
2	6.73 (1H, d, J = 1.6 Hz)
3	-
4	-
5	6.69 (1H, d, J = 8.0 Hz)
6	6.60 (1H, dd, J = 8.0/1.6 Hz)
1'	-

2'	4.26 (1H, dd, $J = 7.6/4.2$ Hz)	
3'	(a) 2.97 (1H, dd, $J = 13.3/4.2$ Hz)	(b) 2.76 (1H, dd, $J = 13.3/7.6$ Hz)

Το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ είναι όμοιο με αυτό του ροσμαρινικού οξέος (AU2) με τη διαφορά ότι εδώ απουσιάζουν τα σήματα του καφεϊκού οξέος, δηλαδή το δεύτερο ABX σύστημα και ο *trans* διπλός δεσμός.

Το 3-(3,4-διϋδροξυφαινουλο)λακτικό οξύ έχει παραληφθεί ξανά από τα υπέργεια τμήματα του είδους *Anchusa azurea* var. *azurea*. Αποτελεί αρκετά διαδεδομένο και φαρμακολογικά μελετημένο μεταβολίτη. Έχει απομονωθεί από είδη όπως *Salvia miltiorrhiza* (Lamiaceae) (ρίζες, βλαστοί, άνθη), *Melissa officinalis* (Lamiaceae) (βλαστοί και φύλλα), *Ranunculus lanuginosus* (Ranunculaceae) (φύλλα) και *Clinopodium laxiflorum* (Lamiaceae) (ολόκληρο το φυτό). Έχει εμφανίσει *in vitro* αντισπαιμική, κυτταροτοξική, αντιυπερτασική δράση και *in vivo* καρδιοπροστατευτική δράση²⁵⁷.

Κλάσμα AURB FR.70-76: 26.9 mg του κλάσματος υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με στατική φάση sephadex LH-20 και κινητή φάση MeOH.



Εικόνα 125. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας των κλασμάτων της sephadex στο κλάσμα AURB FR.70-76. Σύστημα ανάπτυξης EtOAc/MeOH/H₂O/Formic acid 50/10/7/1

Συνολικά παρελήφθησαν 82 κλάσματα, όγκου 500 μL το καθένα, από τα οποία 5 συνενωμένα κλάσματα ελέγχθησαν για το χημικό τους φορτίο με φασματοσκοπία πυρηνικού

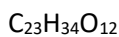
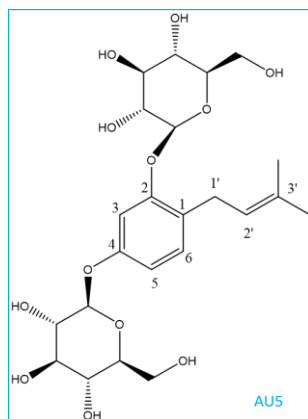
μαγνητικού συντονισμού (NMR).

Κωδικός κλάσματος	Κωδικός NMR	Βάρος δείγματος (mg)
AURB 70-76 19/22	RM70	2.9
AURB 70-76 34/36	RM71	0.3
AURB 70-76 55/59	RM72	-
AURB 70-76 48/50	RM73	-
AURB 70-76 38/42	RM74	0.3

Στο κλάσμα RM70 παραλήφθηκε το 1,5-δισ-(β-D-γλυκοκυρανοσυλοξυ)-2-(3',3'-διμεθυλοαλλυλο) βενζόλιο (AU5).

Στο κλάσμα RM71 παραλήφθηκε η ουριδίνη (AU6).

Ο μεταβολίτης AU5 ταυτοποιήθηκε ως το 1,5-δισ-(β-D-γλυκοκυρανοσυλοξυ)-2-(3',3'-διμεθυλοαλλυλο) βενζόλιο (MW=502.516 g/mol) με τη βοήθεια ¹H-NMR σε διαλύτη MeOD και επιβεβαίωση από τη βιβλιογραφία²⁶². Η ουσία έχει παραληφθεί ξανά από τις ρίζες του είδους *Anchusa strigosa*²⁶².



Πίνακας 47. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 1,5-δισ-(β-D-γλυκοκυρανοσυλοξυ)-2-(3',3'-διμεθυλοαλλυλο) βενζολίου (MeOD, 400 MHz)

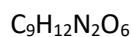
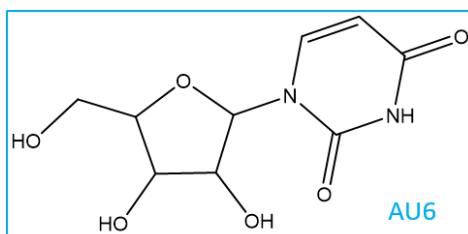
Θέση	¹ H-NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]
1	-
2	-

3	6.90 (1H, d, $J = 3.0$ Hz)	
4	-	
5	6.92 (1H, dd, $J = 8.5/3.0$ Hz)	
6	7.10 (1H, d, $J = 8.5$ Hz)	
1'	3.29 (2H, m)	
2'	5.34 (1H, t, $J = 7.1$ Hz)	
3'	-	
CH₃-3'	1.76, 1.74 (3H, s)	
Glc-1	4.82, 4.79 (1H, d, $J = 7.4$ Hz)	
Glc-2-5	3.30-3.50 (8H, m)*	
Glc-6	(a) 3.90 (1H, dd, $J = 11.2/2.2$ Hz)	(b) 3.72 (1H, dd, $J = 11.2/5.0$ Hz)

*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη σημάτων

Το φάσμα της ουσίας είναι όμοιο με αυτό του μεταβολίτη AU1, με τη διαφορά ότι στην προκειμένη περίπτωση υπάρχουν σάκχαρα συνδεδεμένα στο μόριο.

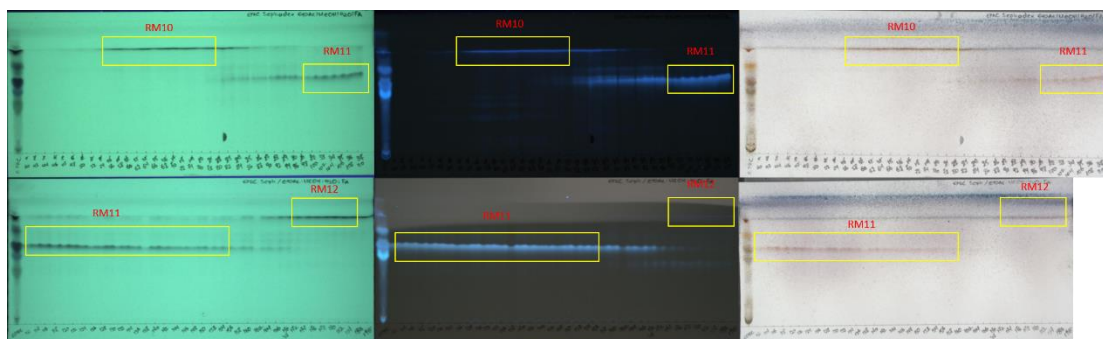
Ο μεταβολίτης **AU6** ταυτοποιήθηκε ως ο πρωτογενής μεταβολίτης, ουριδίνη (MW=244.201 g/mol) με τη βοήθεια ¹H-NMR σε διαλύτη MeOD και επιβεβαίωση από τη βιβλιογραφία²⁴⁹.



Στο φάσμα ¹H-NMR η ουριδίνη εμφανίζει στα 8.03 ppm διπλή κορυφή ($J = 8.4$ Hz), που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του διπλού δεσμού που βρίσκεται δίπλα στο άζωτο, στα 5.72 ppm διπλή κορυφή ($J = 8.4$ Hz), που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του διπλού δεσμού που βρίσκεται δίπλα στο καρβονύλιο και στα 5.92 ppm διπλή κορυφή ($J = 5.1$ Hz) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της ριβόζης στη θέση σύνδεσης των δύο δακτυλίων (H-1'). Οι κορυφές των υπόλοιπων πρωτονίων της ριβόζης εμφανίζονται στα 4.18 ppm (t, $J = 4.8$ Hz, H-2' ριβόζης), στα 4.17 ppm (t, $J = 4.8$ Hz,

H-3' ριβόζης), στα 4.03 ppm (m, H-4' ριβόζης) και στα 3.85 ppm (dd, $J = 12.0/2.6$ Hz, H-5'b ριβόζης) και 3.75 ppm (dd, $J = 12.0/3.2$ Hz, H-5'a ριβόζης).

Τέλος πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (sephadex) στο εκχύλισμα EPRC, το οποίο προήλθε από τις ρίζες του είδους *Echium plantagineum* και εμφάνισε ισχυρή αναστολή της υαλουρονιδάσης ($95.17 \pm 0.39\%$) στα 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$., σε αντίθεση με το εκχύλισμα AURB. Έγινε μια προσπάθεια απομόνωσης του κύριου μεταβολίτη του εκχυλίσματος προκειμένου να γίνει η ταυτοποίησή του και να εξετασθεί το ενδεχόμενο να είναι αυτός ο υπεύθυνος δραστικός παράγοντας του αρχικού εκχυλίσματος. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής: 0.9 g εκχυλίσματος διαλύθηκαν σε 9 mL MeOH, φυγοκεντρήθηκαν και το υπερκείμενο παραλήφθηκε, συμπυκνώθηκε και επαναδιαλυτοποιήθηκε σε σύστημα 94:6 MeOH:H₂O, φυγοκεντρήθηκε και το υπερκείμενο αποτέθηκε στη στήλη προς διαχωρισμό. Η κινητή φάση ήταν 94:6 MeOH:H₂O και συλλέχθηκαν 200 κλάσματα, όγκου 250 μL . Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας φαίνεται παρακάτω (EtOAc/MeOH/H₂O/FA 50/10/7/1):



Προέκυψαν 3 συνενωμένα κλάσματα, τα οποία ελέγχθησαν για το χημικό τους φορτίο με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

Κωδικός κλάσματος	Κωδικός NMR	Βάρος δείγματος (mg)
EPRC 54-78	RM10	1.2
EPRC 100-156	RM11	5.0
EPRC 174-197	RM12	1.4

Η ουσία RM10 ταυτοποιήθηκε ως το ροσμαρινικό οξύ. Το ροσμαρινικό οξύ έχει επιδείξει ισχυρή αναστολή της υαλουρονιδάσης σε διάφορες μελέτες που έχουν διεξαχθεί^{263 264}, ενώ

πολλές φορές χρησιμοποιείται ως πρότυπος αναστολέας του ενζύμου σε βιοδοκιμασίες εύρεσης νέων φυτικών αναστολέων της υαλουρονιδάσης.

11.3.7 Βιολογική αξιολόγηση καθαρών ουσιών

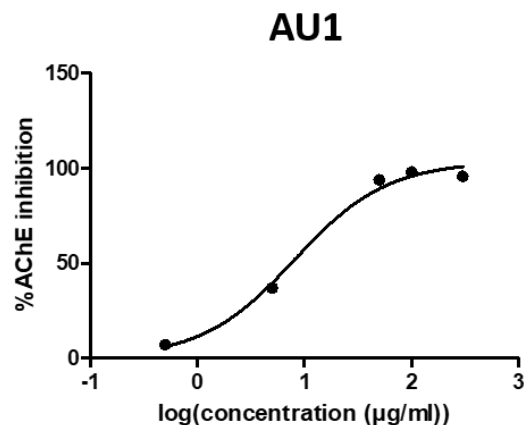
Οι δευτερογενείς μεταβολίτες που απομονώθηκαν από τα εκχυλίσματα AURB και EPRC αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητα αναστολής της AChE (Μέθοδοι Ellman's και NA-FBB) και της Hyal, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (µg/mL). Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 48. % Ενζυμική αναστολή (AChE Ellman's, AChE NA-FBB, Hyal) των καθαρών απομονωμένων ουσιών των εκχυλισμάτων AURB και EPRC, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

	C (µg/ml)	AU1	AU2	AU3	AU5	EPRC100-156 (RM11)
AChE Ellman's	300	95.76±2.97*	39.80±1.27	42.37±0.75	35.66±1.84	28.43±0.64
	100	98.05±0.28	19.64±0.66	21.59±0.58	17.69±0.93	3.92±1.88
	50	93.92±0.49	24.56±3.39	19.87±1.96	12.95±0.51	6.35±1.28
	5	37.06±0.50	12.38±1.73	15.27±1.43	9.32±1.31	5.32±0.64
	0.5	7.20±1.79	13.68±1.26	11.14±5.05	7.14±2.17	2.08±6.52
AChE NA-FBB	100	54.41±1.10	94.76±0.85	-	-	95.45±0.36
	50	21.12±5.30	-	-	-	-
	10	14.34±4.59	-	-	-	-
Hyal	300	-	94.73±0.25	-	-	-
	100	-15.80±4.49	33.08±0.78	52.16±1.57	51.77±2.47	-
	50	-	12.52±5.38	-	-	-

* Δυσκολία στη διαλυτοποίηση

Στη βιοδοκιμασία αναστολής της AChE με τη μέθοδο Ellman's όλοι οι μεταβολίτες εμφάνισαν αξιοσημείωτη δράση στα 300 µg/mL, ενώ η AU1 (πρενυλοϋδροκινόνη) επέδειξε την ισχυρότερη αναστολή. Δημιουργήθηκε καμπύλη συγκέντρωσης-αναστολής και υπολογίστηκε η τιμή IC₅₀= 8.068 µg/mL.



Στη βιοδοκιμασία αναστολής της AChE με τη μέθοδο NA-FBB μεταβολίτες όπως το AU2 (ροσμαρινικό οξύ) παρουσίασαν υψηλά ποσοστά αναστολής της AChE και η ουσία AU1 εμφάνισε σημαντική ικανότητα αναστολής (54.41±1.10%) στα 100 μg/mL. Στη βιοδοκιμασία αναστολής της Hyal μόνο το ροσμαρινικό οξύ και τα παράγωγά του έδειξαν δράση στα 100 μg/mL. Τέλος, σημειώνεται ότι η ουσία AU4 (3-(3,4-διϋδροξυφαινυλο)λακτικό οξύ) δεν αξιολογήθηκε λόγω ελλιπούς ποσότητας.

Είναι η πρώτη φορά που καταγράφεται η ισχυρή αντιχολινεστερασική δράση της πρενυλοϋδροκινόνης (AU1), και με τις δύο μεθόδους αξιολόγησης της ικανότητας αναστολής της AChE. Επίσης δεν υπάρχει αναφορά για τη δράση της ουσίας στην υαλουρονιδάση. Για το ροσμαρινικό οξύ (AU2) έχει αναφερθεί η σημαντική ικανότητα αναστολής της βουτυρυλοχολινεστεράσης και η μέτρια ικανότητα αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης^{265 266}. Σε μελέτη όπου εξετάστηκαν διάφορα φαινολικά οξέα ως προς την ικανότητα αναστολής της βουτυρυλοχολινεστεράσης και της ακετυλοχολινεστεράσης (μέθοδος Ellman's) εξήχθη το συμπέρασμα ότι η ανασταλτική δράση εξαρτάται από τον αριθμό/θέση των ομάδων OH ή/και CH₃O που συνδέονται στο φαινολικό δακτύλιο. Πιστεύεται ότι η CH₃O υποκατάσταση του φαινολικού δακτυλίου μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση υψηλότερης αντιβουτυρυλοχολινεστερασικής δράσης. Η παρουσία ομάδας CH=CH-COOH αυξάνει την ικανότητα αναστολής της AChE σε σύγκριση με τις ομάδες CH₂-CH₂-COOH ή COOH. Μεθυλ- και αιθυλ-εστέρες είναι ισχυρότεροι αναστολείς από τα αντίστοιχα οξέα²⁶⁷. Επίσης είναι γνωστή η σημαντική ικανότητα αναστολής της υαλουρονιδάσης από το ροσμαρινικό οξύ²⁶⁴.

11.4 Συμπεράσματα

Τα εκχυλίσματα που παρασκευάστηκαν από φυτά της οικογένειας Boraginaceae παρουσίασαν ενδιαφέρον φυτοχημικό προφίλ αλλά και σημαντική κυτταροτοξική δράση, με ισχυρότερη αυτή που επέδειξαν τα εκχυλίσματα του γένους *Echium*. Αξιοσημείωτη ήταν και η δράση στους ενζυμικούς στόχους (ακετυλοχολινεστεράση, υαλουρονιδάση και φωσφολιπάση). Στη δοκιμασία αναστολής της AchE την πιο ισχυρή δράση εμφάνισε το εκχύλισμα AURB, που προήλθε από τη ρίζα της *Anchusa undulata* ssp. *hybrida*. Για το λόγο αυτό κλασματώθηκε με φυγόκεντρο χρωματογραφία κατανομής και ακολούθησε η επεξεργασία των κλασμάτων του AURB. Μέσω χρωματογραφικών διαδικασιών παραλήφθηκαν οι ουσίες πρενυλοϋδροκινόνη (παραλαμβάνεται πρώτη φορά από το γένος *Anchusa*), το γλυκοζυλιωμένο παράγωγό της, από την κατηγορία των φαινολικών το 3-(3,4-διϋδροξυφαινυλο)λακτικό οξύ, το ροσμαρινικό οξύ, το σαλβιανολικό οξύ B αλλά και ένας πρωτογενής μεταβολίτης, η ουριδίνη. Η πρενυλοϋδροκινόνη φάνηκε ότι αποτελεί έναν ισχυρό AChE αναστολέα και συνεπώς ευθύνεται για την ισχυρή δράση του εκχυλίσματος. Από το εκχύλισμα [EPRC](#), το οποίο παραλήφθηκε από τη ρίζα του *Echium plantagineum*, απομονώθηκε το ροσμαρινικό οξύ, ως η πιθανά υπεύθυνη ουσία για την ισχυρή δράση του αρχικού εκχυλίσματος στην αναστολή της υαλουρονιδάσης.

11.5 Βιβλιογραφία

235. Koz, O., Pizza, C. & Kirmizigül, S. Triterpene and flavone glycosides from *Anchusa undulata* subsp. *hybrida*. *Nat. Prod. Res.* 23, 284–292 (2009).
236. Zengin, G., Sarikurkcu, C. & Aktumsek, A. Phenolic composition of *Anchusa undulata* L. subsp. *hybrida* (Ten.) Coutinho from Turkey. *J. Med. Herbs Ethnomedicine* 1, 1 (2015).
237. Kuruuzum-Uz, A., Suleyman, H., Cadirci, E., Guvenalp, Z. & Omur Demirezer, L. Investigation on anti-inflammatory and antiulcer activities of *Anchusa azurea* extracts and their major constituent rosmarinic acid. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 67 C, 360–366 (2012).
238. Chua, L. S. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. *J. Ethnopharmacol.* 150, 805–817 (2013).
239. Kelly, G. S. Quercetin. *Altern. Med. Rev.* 16, 172–194 (2011).
240. Al-snafi, A. L. I. E. The pharmacology of *Anchusa italica* and *Anchusa strigosa*. A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 6, 7-10 (2014).
241. El-shazly, A. & Wink, M. Diversity of Pyrrolizidine Alkaloids in the Boraginaceae Structures, Distribution, and Biological Properties. *Diversity* 6; 188–282 (2014). doi:10.3390/d6020188

242. Saad, B., Azaizeh, H. & Said, O. Tradition and Perspectives of Arab Herbal Medicine : A Review *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2, 475–479 (2005).
243. Qasem, J. R. Prospects of wild medicinal and industrial plants of saline habitats in the Jordan Valley. *Pakistan Journal of Botany* 47;551-570 (2016).
244. Hudaib, M., Mohammad, M., Bustanji, Y. & Tayyem, R. Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Jordan , Mujib Nature Reserve and surrounding area. *Journal of Ethnopharmacology* 120; 63–71 (2008).
245. Said, O., Khalil, K., Fulder, S. & Azaizeh, H. Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel , the Golan Heights and the West Bank region. *Journal of Ethnopharmacology* 83;251-265 (2002).
246. Kuruuzum, A., Guvenalp, Z., Kazaz, C., Demirezer, L.O. Phenolic compounds from the roots of *Anchusa azurea* var . *azurea*. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences* 10, 177–184 (2013).
247. Lardos, A. The botanical materia medica of the Iatrosophikon — A collection of prescriptions from a monastery in Cyprus. *Journal of Ethnopharmacology* 104; 387–406 (2006).
248. Taban, K., Eruygur, N. & Üstün, O. Biological activity studies on the aqueous methanol extract of *Anchusa undulata* L . subsp . *hybrida* (Ten .) Coutinho. *Marmara Pharmaceutical Journal* 22; 357–364 (2018).
249. Kang, U. et al. Chemical Constituents of the leaves of *Brassica oleracea* var. *acephala* *Chemistry of Natural Compounds* 54;1023-1026 (2018).
250. Dragana, J., Vasic, S.M., Stankovic, M., Topuzovic, M., Comic, L. The content of secondary metabolites and in vitro biological activity of *Anchusa officinalis* L. (Boraginaceae). *Indian Journal of Traditional knowledge* 15;587-593 (2016).
251. Sarikurkcü, C., Zengin, G., Aktumsek, A. & Ceylan, O. Screening of Possible In Vitro Neuroprotective, Skin Care, Antihyperglycemic, and Antioxidative Effects of *Anchusa undulata* L . subsp . *hybrida* (Ten.) Coutinho from Turkey and Its Fatty Acid Profile. *Int. J. Food Prop.* 18, 1491–1504 (2015).
252. Chukicheva, I. Y. & Fedorova, I. V. Alkylation of phenol and hydroquinone by prenol in the presence of organoaluminum catalysts. *Chemistry of Natural Compounds* 54, 5–9 (2018).
253. Chien, Y. et al. Phytochemistry Secondary metabolites from the root of *Ehretia longiflora* and their biological activities. *Phytochemistry* 80, 50–57 (2012).
254. Appleton, D. R., Chuen, C. S., Berridge, M. V, Webb, V. L. & Copp, B. R. Rossinones A and B, Biologically Active Meroterpenoids from the Antarctic Ascidian, Aplidium species. *J Org Chem* 4;9195–9198 (2009). doi:10.1021/jo901846j
255. Terencio, M. C. et al. Suppression of leukotriene B 4 and tumour necrosis factor α release in acute inflammatory responses by novel prenylated hydroquinone derivatives. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 357;565–572 (1998).
256. Bertanha, C. S. & Januá, A. H. Quinone and Hydroquinone Metabolites from the Ascidians of the Genus Aplidium. *Mar Drugs* 12;3608–3633 (2014). doi:10.3390/md12063608

257. Kuruuzum-Uz, A. et al Four new triterpenes from *Anchusa azurea* var. *azurea*. *Helvetica Chimica Acta* 93;457-465 (2010).
258. Sun, Y., Zhu, H., Wang, J., Liu, Z., Bi, J. Isolation and purification of salvianolic acid A and salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* by high-speed counter-current chromatography and comparison of their antioxidant activity. *Journal of Chromatography B* 877;733-737 (2009).
259. Al-dhabi, N. A. et al. Recent studies on rosmarinic acid and its biological and pharmacological activities. *EXCLI Journal* 13;1192–1195 (2014).
260. Gülçin, İ. et al. Rosmarinic acid inhibits some metabolic enzymes including glutathione S-transferase, butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase isoenzymes. *J Enzyme Inhib Med Chem* 31;1698-1702 (2016).
261. Sidoryk, K., Filip, K., Cmoch, P., Marta, Ł. & Cybulski, M. Efficient synthesis and physicochemical characterization of natural danshensu, its S isomer and intermediates thereof. *Journal of Molecular Structure* 1153, 135–148 (2018).
262. Braca, A., Bader, A., Siciliano, T., Morelli, I. & Tommasi, N. De. New Pyrrolizidine Alkaloids and Glycosides from *Anchusa strigosa*. *Planta Med* 69;835-841 (2003).
263. Ferreira, I. C. et al Hydroxycinnamic Acids and Their Derivatives : Cosmeceutical Significance, Challenges and Future Perspectives , a Review. *Molecules* 22(2) (2017). doi:10.3390/molecules22020281
264. Iwanaga, A., Kusano, G., Warashina, T. & Miyase, T. Hyaluronidase Inhibitors from ' Cimicifugae Rhizoma ' (a Mixture of the Rhizomes of *Cimicifuga dahurica* and *C. heracleifolia*). *J Nat Prod* 73; 573–578 (2010).
265. Kindl, M., T. B. B. D., Bucar, F. & T, S. V. D. Antioxidant and Anticholinesterase Potential of Six *Thymus* Species. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* (2015).
266. Szwajgier, D. Anticholinesterase activity of selected phenolic acids and flavonoids – interaction testing in model solutions. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 22, 690–694 (2015).
267. Szwajgier, D. Anticholinesterase Activity of Phenolic Acids and their Derivatives. *Z Naturforsch* 68;125-132 (2013).

12 *Teucrium divaricatum* ssp. *divaricatum* (Lamiaceae)

12.1 Σκοπός

Οι εθνοφαρμακολογικές αναφορές που υπάρχουν για φυτά της οικογένειας Lamiaceae είναι αρκετές και αφορούν διάφορες θεραπευτικές κατηγορίες. Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε η συλλογή ποικίλων ειδών της οικογένειας προκειμένου να επαληθευθούν ή να διαψευσθούν οι πληροφορίες που προέρχονται από τον Νίκανδρο και τον Ιερόπαιδα. Σκοπός ήταν να συλλεχθούν είδη που ανήκουν σε διαφορετικά γένη ώστε να υπάρχει ποικιλία δευτερογενών μεταβολιτών και κατ' επέκταση βιολογικών δράσεων. Το υδατοαλκοολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του *Teucrium divaricatum* ssp. *divaricatum* μελετήθηκε φυτοχημικά και φαρμακολογικά καθώς οι βιβλιογραφικές αναφορές που αφορούν το είδος είναι περιορισμένες σε αριθμό, παρουσιάζει ενδιαφέρον προφίλ δευτερογενών μεταβολιτών και δε διαφέρει φαρμακολογικά έναντι των εκχυλισμάτων τα οποία προήλθαν από τα άλλα είδη *Teucrium* στους στόχους που μελετήθηκαν.

12.2 Θεωρητικό Μέρος

12.2.1 Αναφορές της δρόγης στα υπό μελέτη κείμενα

Ο Νίκανδρος στους στίχους 63-69 των *Θηριακών* περιγράφει τη χρήση του 'πόλιου' στο κεφάλαιο των υποστρωμάτων (πρόληψη από τα δήγματα των δηλητηριωδών οργανισμών).

Νίκανδρος Αρχαίο Κείμενο 63-69

ἢ σύ γ' ὑποστορέσαιο λύγον πολυανθέα κόψας
ἢ **πολιόν** βαρύσοδμον, ὃ δὴ ρίγιστον ὄδωδεν'
ὥς δ' αὐτῶς ἐχίειον, ὀριγανόεσσά τε χαίτη,
ναὶ μὴν ἀβροτόνοιο τό τ' ἄγριον οὖρεσι θάλλει
ἀργεννὴν ὑπὸ βῆσσαν, ἢ ἐρπύλλοιο νομαίου,
ὅς τε φιλόζωος νοτερὴν ἐπιβόσκειται αἴαν
ρίζοβόλος, λασίοισιν ἀεὶ φύλλοισι κατήρης.

Νικανδρος Μετάφραση 63-69

Μπορείς να κόψεις και να βάλεις στα στρωσίδια σου πολυανθισμένη λυγαριά ἢ **πολιόν** οπού φρικτά βρωμάει· Παρόμοια, φιδοβότανο, της ρίγανης τα φύλλα, και βέβαια της αρτεμισίας τα ἄνθη, που στη μορφή της την ἄγρια πα στα βουνά φυτρώνει, σε κοιλάδες και χαράδρες πυκνόφυτες, και λιόλουστες· κόψε και το πάντα θαλλερό αγριοθύμαρο, που απλώνει τις ρίζες του και φυτρώνει σε γη νοτερή, και είναι κατάφορτο με πλούσιο φύλλωμα.

Εικόνα 126. Απόσπασμα των Θηριακῶν όπου αναφέρεται η θεραπευτική χρήση του πόλιου

Στο ἔργο *Πέρι Ὑλης Ιατρικῆς* ο Διοσκουρίδης κάνει αναφορά στο τεύκριο, στο πόλιο και στο σκόρδιο. Πρόκειται για τρία διαφορετικά εἶδη *Teucrium*. Αρχικά προτείνεται η εφαρμογή του πρώτου εἶδους σε συνδυασμό με ξύδι σε περιπτώσεις δῆγματος από δηλητηριώδη εἶδη, ενώ το δεύτερο εἶδος συστήνεται να χρησιμοποιηθεῖ είτε ως ἀφέψημα μαζί με ξύδι για την ἴδια παθολογική κατάσταση, είτε ως υπόστρωμα ἢ εἰσπνεόμενο για την πρόληψη των δηγμάτων από δηλητηριώδεις οργανισμούς (ακριβῶς ἴδια ἔνδειξη με τον Νίκανδρο). Το σκόρδιο εἰάν βράσει με κρασί μπορεί να χρησιμοποιηθεῖ για την αντιμετώπιση δηλητηριωδῶν δηγμάτων. Τα δύο τελευταία εἶδη *Teucrium* εμφανίζονται και ως ἐπουλωτικά μέσα στο ἔργο *Πέρι Ὑλης Ιατρικῆς* ενώ το σκόρδιο, είτε ως ξηρή δρόγη είτε ως χυμός λαμβανόμενος από το στόμα, μπορεί να μειώσει ἐξογκώματα της σάρκας.

Ο Ιερόπαιδας ἀναφέρει το σκόρδιο ως μέρος μιας θεραπευτικῆς συνταγῆς, η οποία περιέχει μέλι και εφαρμόζεται αλοιφόμενη για την αντιμετώπιση των φακίδων.

12.2.2 Δρογοβοτανική-Γεωγραφική ἐξάπλωση-Βιότοπος

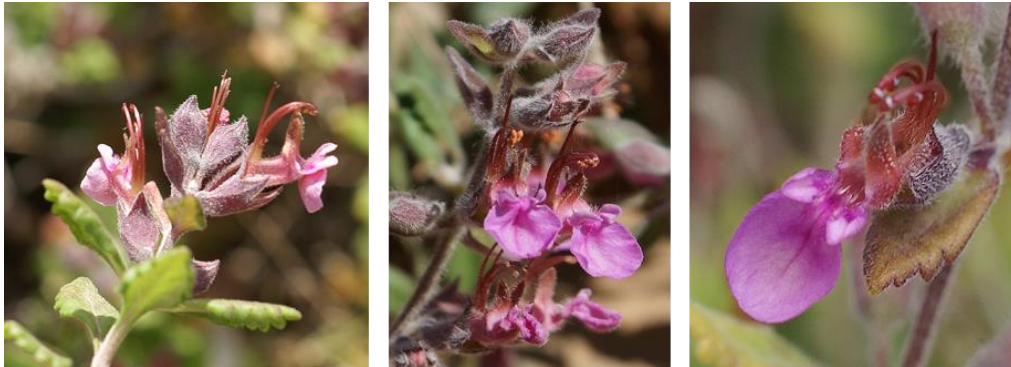
Η **οικογένεια** Lamiales (Labiatae, Mint family) είναι μια χαρακτηριστική οικογένεια η οποία περιλαμβάνει πόες και θάμνους με τετράπλευρους βλαστούς. Τα φύλλα είναι συνήθως ἀπλά, σε ἀντίθετα ζεύγη χωρίς παράφυλλα, ενώ τις περισσότερες φορές αρωματικά και ἀδενώδη. Διατάσσονται σε ἑλικες στους ἄξονες των ἀντίθετων, συχνά ομοιάζοντων με φύλλα

βράκτιων, ενώ είναι δυνατόν οι έλικες να συνδέονται και να σχηματίζουν μια επιμήκη τελική κορυφή-άκρη. Τα άνθη φέρουν κάλυκα πεντάλοβο, κάποιες φορές δίχειλο ενώ η στεφάνη με τα ενωμένα πέταλα είναι σωληνοειδής, συχνά δίχειλη, με το άνω χείλος συχνά μεγαλύτερο και το κάτω χείλος διαχωρισμένο σε 3 λοβούς. Οι στήμονες είναι 4, πάνω στα πέταλα και σπανίως 2. Ο καρπός αποτελείται από 4 σπόρους.

Το **γένος** *Teucrium* L. περιλαμβάνει πόες ή θάμνους με ριζώματα ή παραφυάδες. Ο βλαστός είναι σε όρθια έκφυση ή ανιών, απλός ή διακλαδισμένος από τη βάση. Τα φύλλα είναι απλά, με μίσχο ή σχεδόν επιφυή, καρδιοειδή έως λογχοειδή. Οι σπόνδυλοι φέρουν 2-6 άνθη, βράκτια ρομβοειδώς ωοειδή έως γραμμοειδώς λογχοειδή, με χείλη ακέραια ή οδοντωτά. Ο κάλυκας απαντάται με 10 νεύρα, σωληνοειδής έως κωδωνοειδής, διογκωμένος στη βάση της μπροστινής πλευράς, δίχειλος ή ακτινόμορφος, 5-οδοντωτός (3+2) με τους οδόντες ίσους ή τους ανώτερους μεγαλύτερους. Η στεφάνη είναι μονόχειλη με απουσία άνω χείλους και 5-λοβο κάτω χείλος, με τον μεσαίο λοβό πολύ μεγαλύτερο, κυκλικό έως σπατουλοειδή, περιστασιακά 2-λοβο, ενώ ο σωλήνας της στεφάνης δε φέρει δακτύλιο τριχών εσωτερικά και είναι συχνά περικλειόμενος στον κάλυκα. Τα κάρυα είναι ομαλά ή με δικτυωτή νεύρωση. Στο συγκεκριμένο γένος περιλαμβάνονται περίπου 300 είδη. Δεκαοκτώ από αυτά απαντώνται στην Ελλάδα και 7 είναι ενδημικά²⁶⁸.

Το **υποείδος** *Teucrium divaricatum* ssp. *divaricatum* Sieber ex Heldr. 1856 (κοινά ονόματα hedge germander, Aegean sage germander [En], τεύκριο το διεστώς [Gr]) (syn. *Teucrium divaricatum* ssp. *sieberi* (Čelak.) Holmboe, *Teucrium divaricatum* ssp. *villosum* (Čelak.) Rech.) απαντάται στα νησιά του Ανατολικού Αιγαίου, την Κρήτη, την Ανατολική Ελλάδα, το Ισραήλ, την Παλαιστίνη, την Ιορδανία, το Λίβανο, τη Συρία και την Τουρκία. Η περίοδος ανθοφορίας είναι από το Μάιο μέχρι τον Ιούνιο και προτιμά γυμνές και ξηρές περιοχές, ανοιχτούς δασότοπους και πετρώδεις θαμνότοπους, υψόμετρα από 100-1600 μέτρα. Το *Teucrium divaricatum* ssp. *divaricatum* ανήκει στον υποπληθυσμό *Chamaedrys* Schreber. Πρόκειται για ένα πολυετές διακλαδισμένο φρύγανο, ύψους 10-30 cm, με αποξυλωμένους, απαλά χνουδωτούς βλαστούς με βραχείες, ουλώδεις, συνήθως προς τα έξω και κάτω κυρτές τρίχες. Τα φύλλα είναι σχεδόν λεία με μήκος 1-2.5 cm, ωοειδή, βραχέως οδοντωτά, με σφηνοειδή βάση. Ο κάλυκας είναι κοκκινοκαφετί, σωληνοειδής, οδοντωτός, τριχωτός. Φέρει άνθη με μήκος έως 1.5 cm, με στεφάνη ρόδινη ή πορφυρή και τριχωτό σωλήνα μακρύτερο από τον κάλυκα. Ιδιαίτερο

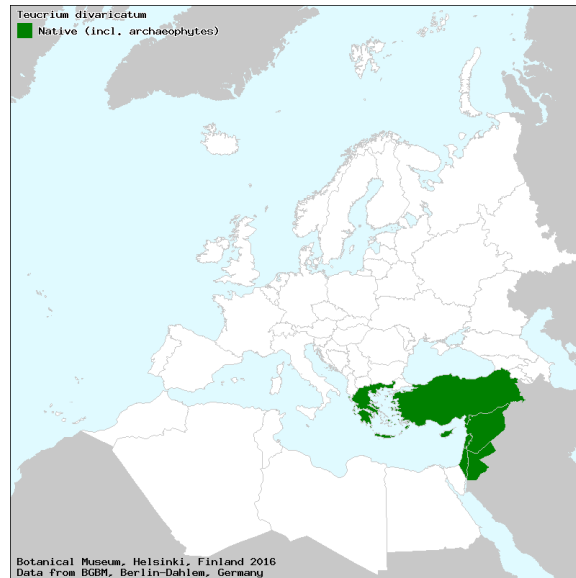
χαρακτηριστικό αποτελούν οι μεγάλοι στήμονες, καθώς και ο έντονα αναδιπλωμένος μεσαίος λοβός του κάτω χείλους.



Εικόνα 127. *Teucrium divaricatum* ssp. *divaricatum*

Συστηματική κατάταξη σύμφωνα με το σύστημα που έχει υιοθετήσει το USDA (<https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=TEUCR>):

Βασίλειο (Kingdom)	Φυτά (<i>Plantae</i>)
Υποβασίλειο (Subkingdom)	Τραχεόφυτα (<i>Tracheobionta</i>)
Υπεράθροισμα (Superdivision)	Σπερματοφύτα (<i>Spermatophyta</i>)
Άθροισμα (Division)	Ανθοφόρα φυτά (<i>Magnoliophyta</i>)
Κλάση (Class)	Δικοτυλήδονα (<i>Magnoliopsida</i>)-
Υποκλάση (Subclass)	<i>Asteridae</i>
Τάξη (Order)	<i>Lamiales</i>
Οικογένεια (Family)	<i>Lamiaceae</i>
Γένος (Genus)	<i>Teucrium</i> L.
Είδος (Species)	<i>Teucrium divaricatum</i> Sieber ex Heldr.



Εικόνα 128. Κατανομή του είδους *Teucrium divaricatum*

12.2.3 Δρογοϊστορία-Δρογοετυμολογία

Το γένος *Teucrium* πιθανόν οφείλει το ονόμα του στο Διοσκουρίδη ο οποίος το ονόμασε έτσι χάρις στον ήρωα και βασιλιά της Τροίας, Τεύκρο. Ο όρος *divaricatum* υποδηλώνει την τάση ευρείας εξάπλωσης του φυτού, γι' αυτό και η κοινή ονομασία είναι τεύκριο το απλωτό (*divaricatus*, a, um > *divarico* απλώνω, ξεδιπλώνω). Άλλες κοινές ονομασίες του είδους είναι δοντοχόρτι και ντιβαρικάτο.

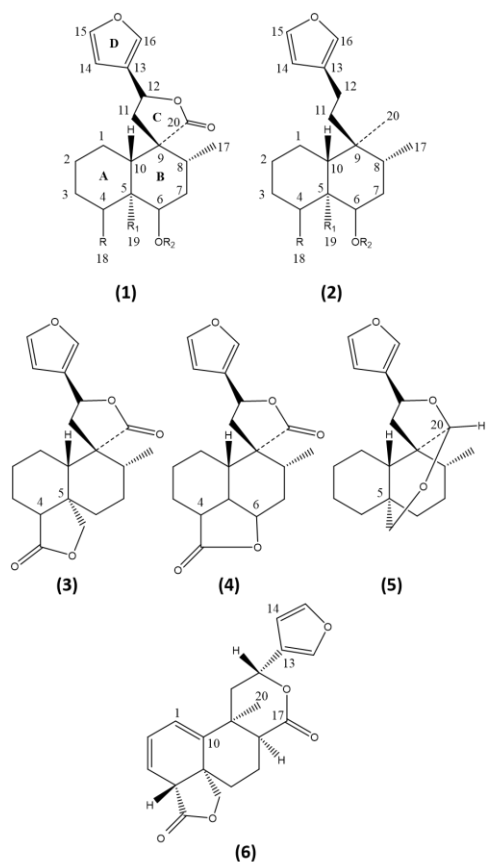


Εικόνα 129. *Teucrium divaricatum* ssp. *divaricatum*

12.2.4 Δρογοχημεία

Τα διτερπένια του νεο-κλεροδανίου αποτελούν τους χημειοταξινομικούς δείκτες του γένους αν και χημικές αναλύσεις που έχουν πραγματοποιηθεί σε ορισμένα είδη, έχουν αποκαλύψει την ύπαρξη αναδιατεταγμένων διτερπενίων του νεοκλεροδανίου ή του αβιετανίου, σεσκιτερπενίων, τριτερπενίων και στεροειδών. Τα φλαβονοειδή και τα αρωματικά συστατικά, παρότι δε βρίσκονται σε τόση αφθονία, όση στο γένος *Salvia* που ανήκει στην ίδια οικογένεια, εντοπίζονται και στο *Teucrium*. Άλλες κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών που έχουν απομονωθεί από το γένος *Teucrium* L. είναι οι γλυκοσίδες φαινυλαιθανοειδών, γλυκοσίδες ιριδοειδών, σαπωνίνες και συστατικά αιθέριων ελαίων. Οι αναφορές που συναντώνται στη βιβλιογραφία για το υποείδος *Teucrium divaricatum* ssp. *divaricatum* είναι μόνο 3, ενώ για το είδος *Teucrium divaricatum* 16. Ωστόσο το *Teucrium divaricatum* ssp. *divaricatum* ομοιάζει χημικά με το *Teucrium chamaedrys*, οπότε από εκεί αντλούνται οι περισσότερες πληροφορίες για το μεταβολικό προφίλ του υπό μελέτη είδους.

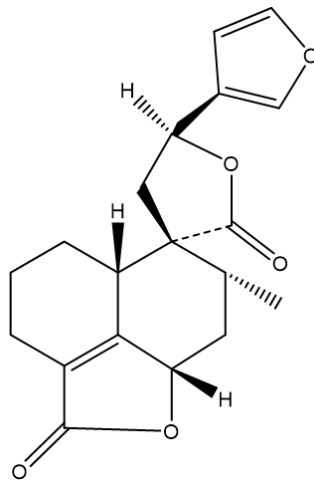
Διτερπένια του νεο-κλεροδανίου: Τα διτερπένια του νεο-κλεροδανίου αποτελούν βασική κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών του γένους. Όταν στη δομή ενός διτερπενίου υπάρχει υδρογόνο στον C-10α και μεθύλιο στον C-5β (Me-19) υποδηλώνεται η παρουσία σκελετού κλεροδανίου, ενώ όταν οι προαναφερόμενοι υποκαταστάτες έχουν τον το αντίθετο προσανατολισμό έχουμε εντ-κλεροδάνιο. Με την πάροδο των έτων τα πρώτα ονομάστηκαν εντ-νεο-κλεροδάνια και τα τελευταία νεο-κλεροδάνια. Τα νεο-κλεροδάνια αποτελούνται από 3 ή 4 δακτύλιους. Μια πενταμελής σπιρο-λακτόνη ή ένας δακτύλιος λακτόλης συζεύγνυται στο δακτύλιο Β και συγκεκριμένα στον C-9, ο οποίος υπολογίζεται ως ο τρίτος δακτύλιος (δακτύλιος C), ενώ σε άλλες περιπτώσεις ο πενταμελής δακτύλιος απουσιάζει και μια αιθυλενο- ομάδα συνδέεται στην ίδια θέση. Ένας δακτύλιος φουρανίου, ο οποίος συνδέεται είτε με το δακτύλιο C (1) είτε με την αιθυλενο-ομάδα (2), είναι σχεδόν πάντα παρόν και συνιστά τον τρίτο ή τέταρτο δακτύλιο του μορίου. Επιπλέον δακτύλιοι μπορούν να σχηματιστούν είτε ως λακτόνες είτε ως αιθέρες μεταξύ C4-C5 (3), C4-C6 (4), C5-C20 (5) ή σε κάποιες άλλες θέσεις. Αντί για την παρουσία ενός πενταμελούς δακτυλίου ως δακτύλιο C, σπανιότερα εντοπίζεται ένας εξαμελής δακτύλιος πυρανίου, αν και αυτού του τύπου τα μόρια συναντώνται κυρίως σε είδη του γένους *Salvia*.



Εικόνα 130. Σκελετοί βασικών κατηγοριών διτερπενίων του νεο-κλεροδανίου

Συνήθως η στεreoχημεία του C-12 είναι β , κάτι το οποίο εξάγεται ως συμπέρασμα από το φάσμα $^1\text{H-NMR}$. Ωστόσο, όταν υπάρχει ένα υδροξύλιο ή ένα ακετύλιο ως υποκαταστάτης στον C-12, τότε προκύπτουν ορισμένα στερεοχημικά ζητήματα. Εάν ο δακτύλιος C είναι παρόν, η διαμόρφωση του στο χώρο είναι συνήθως 12S, αν και 12R διαμόρφωση είναι πιθανόν να απαντάται σε κάποια μόρια (τεουπολίνη I (teurolin I), *T. polium*). Η παρουσία φουρανικού δακτυλίου γίνεται αντιληπτή από τις ζώνες στα 1490 cm^{-1} και στα 870 cm^{-1} στο φάσμα IR, τη χαρακτηριστική χρώση Erlich και τα δεδομένα των πειραμάτων NMR. Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ οι κορυφές που παρατηρούνται στα 7.40-7.45 ppm (2H, d) και στα 6.30-6.40 ppm (1H, dd) αντιστοιχούν στα 2 α πρωτόνια και στο 1 β του φουρανικού δακτυλίου. Στο φάσμα MS, ο φουρανικός δακτύλιος αναγνωρίζεται από τα θραύσματα m/z 94 και 81. Το H-12 αποτελεί το X μέρος ενός A_2X συστήματος, όπου τα 2 πρωτόνια του C-11 αποτελούν το A_2 μέρος και εμφανίζονται ως διπλή κορυφή ($J = 8.5\text{ Hz}$) στα 2.50-2.55 ppm (τεουσβίνη, teucvin). Τα παράγωγα του παραπάνω μορίου, μοντανίνη A και B, παραλήφθηκαν από το είδος *T. montanum* L. Και στα 2 μόρια ο φουρανικός δακτύλιος συνδέεται στον C-12 με β στεreoχημεία, και το σήμα του H-12

εντοπίζεται στα 5.38 ppm (1H, t, $J=8$ Hz) ενώ του H-13 στα 5.28 ppm (1H, t, $J=8$ Hz). Από το είδος *T. flavum* έχουν απομονωθεί η τεουσβιδίνη (teucvidin) και το 3β-υδροξυ- παράγωγό της, τεουφλιδίνη (teuflidin). Οι δύο ουσίες είναι τα C-6 και C-10 επιμερή της τεουσβίνης. Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ των ουσιών αυτών, εντοπίζεται μια τριπλή κορυφή στα 5.43 ppm ($J= 8.5$ Hz, H-12a) και 2 διπλές διπλών κορυφές στα 2.75 ppm (1H, dd, $J= 8.5$ Hz και 14.5 Hz) και 1.90 (1H, dd, $J= 8.5$ Hz και 14.5 Hz) οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια της θέσης 11, οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για τη β-θέση του φουρανικού δακτυλίου. Το C-10 επιμερές της τεουσβιδίνης, η τεουφλίνη (teuflin), είναι ένα σπάνιο παράγωγο το οποίο έχει εντοπιστεί στο ίδιο φυτικό υλικό.



Εικόνα 131. Teucvin

Τα είδη του γένους *Teucrium* έχουν χρησιμοποιηθεί στη λαϊκή θεραπευτική ως διουρητικά, στυπτικά, διεγερτικά και τονωτικά, αντισηπτικά, αντιπυρετικά και αντιφλεγμονώδη. Το *T. cubense* για παράδειγμα χρησιμοποιείται εναντίον των στομαχικών πόνων και ως αντιμικροβιακό. Το διτερπένιο τεουστζαπονίνη Α (teucjaronin A) που έχει παραληφθεί από το *T. jaronicum* επέδειξε σημαντική δράση εναντίον φυτοπαθογόνων οργανισμών. Τα διτερπένια του νεο-κλεροδανίου εμφανίζουν οικονομικό ενδιαφέρον λόγω της εντομοκτόνου δράσης τους εναντίον παρασίτων, όπως είναι τα είδη *Lepidopterous*, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνεται και από το σημαντικό αριθμό των μελετών σχετικά με αυτό το θέμα. Γενικότερα τα διτερπένια του νεο-κλεροδανίου παρουσιάζουν αντιδιατροφική των εντόμων δράση και χρησιμοποιούνται ως αντιμυκητιασικοί, κυτταροτοξικοί και αντιβακτηριακοί παράγοντες.

Τα διτερπένια του νεο-κλεροδανίου παραλαμβάνονται από τα υπέργεια τμήματα των ειδών *Teucrium*, ενώ από τις ρίζες τους έχουν παραληφθεί τα αναδιατεταγμένα διτερπένια του

αβιετανίου. Οι τεουβινσενόνες A, B, C και D (teuvincenones A, B, C, D) αποτέλεσαν τις πρώτες ουσίες αυτής της ομάδας οι οποίες εντοπίστηκαν στις ρίζες του είδους *T. rolium* subsp. *vincentinum*. Οι τεουβινσενόνες C και D συνιστούν ένα νέο σκελετό υδρογονάνθρακα ο οποίος φέρει ένα δακτύλιο κυκλοπροπανίου αποτελούμενο από τους άνθρακες C-3, C-4 και C-18 του 17(15-16)-αβιο-αβιετανικού μοτίβου. Η τεουβινσενόνες E, F και G έχουν απομονωθεί από τις ρίζες του είδους *T. fruticans*. Τέσσερα παράγωγα αυτής της κατηγορίας έχουν απομονωθεί από το είδος *T. rolium* subsp. *expansum*, δύο από τα οποία είναι οι τεουβινσενόνες H και I. Σε φυτοχημική μελέτη ολόκληρου του φυτού *T. divaricatum* subsp. *villosum* παραλήφθηκαν η τεουβινσενόνη B και τρία ακόμη διτερπένια του αβιετανίου, οι βιλλοσίνες A, B και C, οι οποίες είναι τα 17 (15->16) αβιο-αβιετανικά παράγωγα που είναι όμοια με τις τεουβινσενόνες. Από τα υπέργεια τμήματα του είδους *Teucrium alyssifolium* έχουν απομονωθεί έξι αναδιατεταγμένα διτερπένια νεο-κλεροδανίου, όπως οι αλυσίνες D και E. Τα έξι αυτά συστατικά φέρουν τα τυπικά δομικά χαρακτηριστικά των διτερπενίων του νεοκλεροδανίου, μόνο που αντί του μονοποκατεστημένου φουρανίου, έχουν όλα ένα α,β-δισ-υποκατεστημένο φουρανικό δακτύλιο.

Τριτερπενικά και στεροειδικά παράγωγα έχουν επίσης απομονωθεί από είδη *Teucrium*. Τριτερπενικά οξέα όπως το ουρσολικό οξύ, το ολεανολικό οξύ και μικρές ποσότητες από μικρομερικό οξύ έχουν απομονωθεί από το *T. fruticans*, ενώ η α-αμυρίνη, η λουπεόλη, η σιτοστερόλη και η στιγμαστερόλη είναι παρούσες στο είδος *T. divaricatum* subsp. *villosum*. Γενικότερα, τα πιο συχνά απαντώμενα στεροειδή τα οποία έχουν ανιχνευθεί είναι η στιγμαστερόλη, η β-σιτοστερόλη, η μπρασικαστερόλη, η κλεροστερόλη και η καμπεστερόλη. Η 3β-υδροξυστιγμαστ-24 (24¹), 25-διεν-(24²)-άλη, η 3β-υδροξυ-24α-αιθυλοχολεστα-5, 25-διεν-7-όνη, η σιτοστερόλη και η 24α-αιθυλοχολεστα-5, 25-διεν-3β-όλη έχουν εντοπιστεί στα υπέργεια τμήματα του είδους *T. chamaedrys* subsp. *chamaedrys*. Από το ίδιο φυτό παραλήφθηκαν επιπλέον η α-αμυρίνη και το ουρσολικό οξύ.

Από τα υπέργεια τμήματα του *T. rolium* έχουν απομονωθεί τρία ισοπρενοειδή, τα οποία ονομάζονται τεουβινσεντίνες A, B και C. Το σεσκιτερπενοειδές β-ευδεσμόλη έχει απομονωθεί από το είδος *Teucrium rolium*. Από το ισπανικό είδος *T. caroliraii*, το οποίο αναπτύσσεται μονάχα σε μικρές περιοχές της Νοτιο-Ανατολικής Ισπανίας, απομονώθηκε το σεσκιτερπένιο 11-υδροξυ-βαλεν-1(10)-εν-2-όνη. Σεσκιτερπένια του γουαγιανίου, όπως η τεουκλαδιόλη, η τεουκλατριόλη και η 10-επιτεουκλατριόλη παραλήφθηκαν από τα υπέργεια τμήματα του *T.*

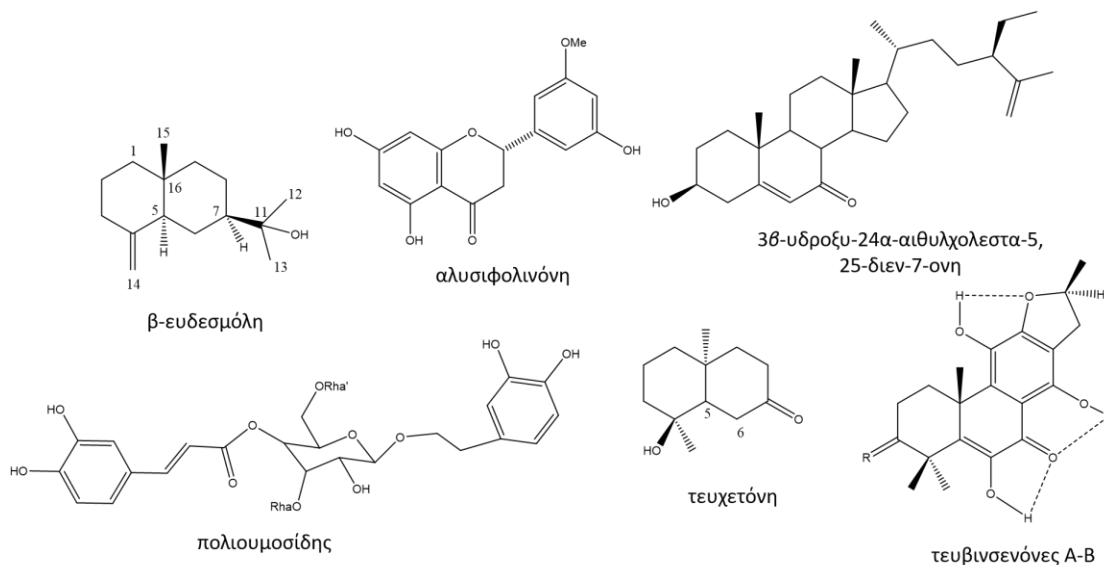
leucocladum. Το αιθέριο έλαιο του *T. polium* περιέχει ως κύρια συστατικά (78.6%) σεσκιτερπενοειδή και συγκεκριμένα τις σεσκιτερπενικές αλκοόλες β-ευδεσμόλη και α-καδινόλη. Το *Teucrium heterophyllum* περιέχει έναν αριθμό σεσκιτερπενίων, όπως είναι η τεουκδιόλη Α, η τεουκδιόλη Β και η τεουκρενόνη, η 7-επιτεουκρενόνη Β, καθώς και νορ-σεσκιτερπένια όπως η τεου(χ)ετόνη (teuhetone).

Φλαβονοειδή έχουν παραληφθεί από τα υπέργεια τμήματα ειδών *Teucrium* αν και δεν αποτελούν κύρια συστατικά. Μερικά από αυτά είναι η ρουτίνη, η απιγενίνη, ο απιγενινο-7,4'-διμεθυλαιθέρας, η λουτεολίνη, η 6-υδροξυλουτεολίνη, ο 7-Ο-γλυκοσίδης της λουτεολίνης, η σαλβιγενίνη, ο 7-γλυκοσίδης της απιγενίνης, η ευπατορίνη, ο 5-γαλλοϋλογλυκοσίδης της απιγενίνης, η 3',6-διμεθοξυαπιγενίνη και η 4',7-διμεθοξυαπιγενίνη. Η λουτεολίνη έχει παραληφθεί από το είδος *T. scorodonia*, η σαλβιγενίνη από το *T. flavum*, η σαλβιγενίνη και η σιρσιμαριτίνη από το *T. massiliense*, η λουτεολίνη, ο 7-Ο-γλυκοσίδης της λουτεολίνης και η 6-μεθοξυγκενκβανίνη (6-methoxygenkwanin) από το *T. polium*, η σιρσιλιόλη, η απιγενίνη από τα υπέργεια τμήματα του *T. polium* subsp. *vincentinum*, καθώς και η σιρσιλιόλη από το *T. montanum*. Επίσης, έχουν απομονωθεί οι ουσίες σιρσιλιόλη, απιγενίνη, πεκτολιναριγενίνη, ναριγενίνη από το *T. chamaedrys* subsp. *chamaedrys*, η σιρσιλιόλη, η ευπατιλίνη και η απιγενίνη από το *T. divaricatum* subsp. *villosum*, η σαλβιγενίνη, η σιρσιμαριτίνη, η 3'-Ο-μεθυλευπατονίνη από το *T. heterophyllum*. Το *T. alyssifolium* περιέχει τις φλαβόνες σιρσιλιόλη, σιρσιλινοέλη, και λουτεολινο-6, 7, 3', 4'-τετραμεθυλαιθέρα και τη φλαβονόνη αλυσιφολινόνη.

Σε είδη του γένους *Teucrium* έχουν εντοπιστεί γλυκοσίδες εστέρων καφεϊκού οξέος, όπως ο πολιουμοσίδης (poliumoside) που έχει παραληφθεί από το *T. belion* και η δομή του αποδόθηκε ως β-(3',4'-διυδροξυφαινυλο)-αιθυλο]-(3,6-Ο-α-L-δισαμνοπυρανοσυλο)-(4-Ο-καφεοϋλο)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης. Από το *T. chamaedrys* έχει απομονωθεί ο τεουκραιοσίδης (teucrioside) που αποτελεί ένα γλυκοσίδη φαινυλοπροπανοειδούς. Η δομή του αποδόθηκε ως ο 3,4-διυδροξυ-β-φαινυλαιθοξυ-Ο-α-L-ξυλοπυρανοσυλο-(1-2)α-L-ραμνοπυρανοσυλο-(1-3)-4-καφεοϋλο-β-D-γλυκοπυρανοσίδης.

Στα υπέργεια τμήματα ειδών *Teucrium* εντοπίζονται γλυκοσίδες των ιριδοειδών, όπως ο τεουκαρδοσίδης από το *T. polium*.

Τα αιθέρια έλαια που έχουν παραληφθεί από τα υπέργεια τμήματα ελληνικού *T. divaricatum* ssp. *divaricatum*, σε διαφορετικές περιόδους ωρίμανσης, αποτελούν πολύπλοκα μείγματα τα οποία περιέχουν κυρίως σесκιτερπενικούς υδρογονάνθρακες, με ποσοστά που ποικίλουν από 62.5% έως 53.1% και το δ-καδινένιο να είναι το κύριο συστατικό²⁶⁸. Το αιθέριο έλαιο του είδους *T. polium* περιέχει κυρίως γερμακρένιο D (11.9%-23.6% ανάλογα με τη γεωγραφική προέλευση π.χ. Ιορδανίας), ενώ τα κύρια συστατικά στο τουρκικό είδος είναι τα β-καρυοφυλένιο (18%), β-πινένιο (18%) και α-πινένιο (12%). Τα α-πινένιο και β-πινένιο αποτελούν τα κύρια συστατικά των αιθερίων ελαίων του *T. polium* ssp. *valentinum* της Τουρκίας (7.58% και 10.18%, αντίστοιχα) και της Ισπανίας (15.8% και 1.7%, αντίστοιχα). Στην περίπτωση του είδους της Ιορδανίας οι ουσίες 8-κεδρεν-13-όλη (24.8%), β-καρυοφυλένιο (8.7%), σαβινένιο (5.2%) και γερμακρένιο D (6.8%) αποτελούν τις κυριότερες. Άλλα συστατικά όπως η καρδινόλη (46.8%) και το 3β-υδροξυ-α-μουουρολένιο (22.5%) έχουν παραληφθεί στο αιθέριο έλαιο των υπέργειων τμημάτων του *T. polium* ssp. *aurasiacum* από την Αλγερία με τη τεχνική της υδραπόσταξης²⁶⁹.



Εικόνα 132. Δευτερογενείς μεταβολίτες του γένους *Teucrium*

12.2.5 Δρογοφαρμακολογία

Εθνοφαρμακολογικές-Παραδοσιακές Χρήσεις Χρήσεις

Είδη του γένους *Teucrium* χρησιμοποιούνται παραδοσιακά σε διάφορες χώρες σχεδόν 2000 χρόνια. Το *Teucrium polium* είναι δημοφιλές εξαιτίας της σημαντικής θέσης που κατέχει στη λαϊκή θεραπευτική διαφόρων λαών. Στην Αίγυπτο, χρησιμοποιείται ως ορεξιόγONO,

αποχρεμπτικό και υπογλυκαιμικό. Επίσης χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση του στομαχικού πόνου και για την προαγωγή της επούλωσης πληγών. Το είδος παρουσιάζει και αντισπασμωδική δράση. Στην παραδοσιακή θεραπευτική, το *T. polium* έχει χρησιμοποιηθεί ως αφέψημα για την αντιμετώπιση διαφόρων παθολογικών διαταραχών, όπως φλεγμονές, παθήσεις του γαστρεντερικού συστήματος, ρευματισμοί και διαβήτης. Τσάι του *T. polium* συνήθως χρησιμοποιείται στη θεραπευτική του Ιράν για την καταπολέμηση παθήσεων όπως δυσπεψία, κοιλιακός πόνος, διαβήτης τύπου II και κοινό κρυολόγημα, ενώ στη λαϊκή θεραπευτική του Ιράν είναι βοηθητικό σε φλεγμονές του γαστρεντερικού, όπως επίσης και αντισπασμωδικό, ανθελμινθικό και διουρητικό. Στη λαϊκή θεραπευτική άλλων χωρών χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση ηπατικών διαταραχών, ελκών, δυσπεψίας, πονοκεφάλων, κολικών, νεφρικών λίθων, όπως επίσης και ως επούλωτικό πληγών και αντιτυρετικό, ορεξιόγono, αποχρεμπτικό και για τη θεραπεία της ευλογιάς. Το ισπανικό ενδημικό είδος *Teucrium buxifolium* έχει αξιοποιηθεί για την καταπολέμηση ρευματικών και φλεγμονωδών διαταραχών²⁶⁹.

Σύγχρονες φαρμακολογικές μελέτες

Πολλές είναι οι φαρμακολογικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε διάφορα είδη *Teucrium*, προκειμένου να τεκμηριωθεί επιστημονικά η παραδοσιακή τους χρήση. Η αξιοσημείωτη αντισπασμωδική δράση που έχει επιδείξει το αιθέριο έλαιο του *T. polium*, η οποία είναι συγκρίσιμη με αυτήν της υοσκίνης και της ινδομεθακίνης, πιθανά οφείλεται στην παρουσία σεσκιτερπενικών αλκοολών. *In vivo* αναλγητική δράση επί του σπλαχνικού πόνου επέδειξε το αιθέριο έλαιο του *T. polium*. Φαίνεται ότι τα περιεχόμενα φλαβονοειδή και οι στερόλες συμβάλλουν στην αντιφλεγμονώδη δράση των εκχυλισμάτων *Teucrium*. Αρκετές μελέτες υποστηρίζουν την *κυτταροπροστατευτική* και *αντι-ελκωτική* δράση του *Teucrium*. Αγωγή με εκχύλισμα *Teucrium* σταμάτησε την έκκριση οξέος από τα βρεγματικά κύτταρα του στομάχου, ενώ συγχρόνως προκλήθηκε διέγερση του σχηματισμού της γαστρικής βλέννας από τα κύρια κύτταρα. Άλλη μελέτη ανέδειξε την *ηπατοπροστατευτική* δράση του αιθανολικού εκχυλίσματος *Teucrium*.

Προκειμένου να αξιολογηθεί η αναλγητική δράση και η κατευναστική επί του ΚΝΣ, αλλά και να προσδιοριστεί η οξεία τοξικότητα, 4 είδη *Teucrium* μελετήθηκαν (*T. cartaginenses* Linn., *T. flavum* Linn., *T. rumillum* Linn. και *T. buxifolium* Linn). Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε μύες στους οποίους τα εκχυλίσματα χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά. Όλα τα παρασκευάσματα που

εξετάστηκαν εμφάνισαν περιορισμένη τοξικότητα. Τα περισσότερα εκχυλίσματα επέδειξαν κατευναστική επί του ΚΝΣ δράση. Κανένα από αυτά δεν παρουσίασε ισχυρή δράση αν και φάνηκε ότι ασκούν σημαντική επίδραση στα μηχανικά και χημικά ερεθίσματα, οπότε και συμπεραίνεται η επαγωγή μιας περιφερικής αναλγητικής δράσης. Αποτέλεσμα της μελέτης είναι ότι τα μεθανολικά και διχλωρομεθανικά εκχυλίσματα των φύλλων και βλαστών του *T. cartaginenses* και του *T. buxifolium* διαθέτουν κεντρική κατευναστική και μέτρια περιφερική αναλγητική δράση.

Διάφορα είδη του γένους *Teucrium* προκαλούν εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών *in vitro* και *in vivo*. Φαινυλαιθανοειδείς γλυκοσίδες (π.χ. πολιουμοσίδης) του *Teucrium polium* L. var. *gnaphalodes* (Lamiaceae)²⁷¹ αποτελούν τα υπεύθυνα συστατικά για την *αντιοξειδωτική δράση* του εκχυλίσματος. Όπως έχει παρατηρηθεί η θεραπευτική δράση πολλών φαρμακευτικών φυτών αποδίδεται στις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Τα υδατικά εκχυλίσματα των φύλλων και των βλαστών του *Teucrium* έχει βρεθεί ότι αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξειδωση που επάγεται από το σίδηρο στο ήπαρ επίμυων. Φυτικής προέλευσης παράγοντες μπορούν να αποτρέψουν την αθηροσκλήρωση και τις καρδιαγγειακές παθήσεις, μέσω της μείωσης του σχηματισμού των οξειδωτικών λιπιδίων και της τροποποίησης του μεταβολισμού τους. Εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του *Teucrium* μπορεί να αναστείλει τις οξειδωτικές διαδικασίες. Το οξειδωτικό στρες είναι ως γνωστόν υπεύθυνο για την παθογένεια διαφόρων παθήσεων όπως φλεγμονή του εντέρου, διαβήτης, υπερλιπιδαιμία, ηπατοτοξικότητα, οστεοπόρωση κ.ά., γι αυτό και η χρήση αντιοξειδωτικών έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να ανακουφίσει ή να ακόμη και να αναστρέψει τις προαναφερόμενες νόσους.

Έχει ακόμη αναφερθεί η *υπολιπιδαιμική δράση* αυτού του γένους. Το υδατικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του *Teucrium*, που χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά σε δόσεις 50-150 mg/kg για 10 ημέρες, ελάττωσε τα επίπεδα της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων στο αίμα σε υπερλιπιδαιμικούς μύες. Επίσης, διαφορετικά είδη *Teucrium* μείωσαν τη μέση αρτηριακή πίεση και τον καρδιακό ρυθμό. Τόσο το μεθανολικό όσο και το διχλωρομεθανικό εκχύλισμα ειδών του γένους *Teucrium* εμφανίζουν *αντιυπερτασικές ιδιότητες*. Η *αντιδιαβητική δράση* του γένους *Teucrium* αποτελεί τη δημοφιλέστερη και περισσότερο μελετημένη δράση. *In vitro* και *in vivo* πειράματα, καθώς και μια μελέτη σε ανθρώπους, έχουν αναδείξει την ινσουλινοτροποποιητική ικανότητα του *Teucrium* και τη μείωση των επιπέδων της γλυκόζης του αίματος. Το ολικό εκχύλισμα του *Teucrium* ενισχύει την έκκριση της ινσουλίνης από το πάγκρεας

σε ποσοστό που φτάνει μέχρι και 135% μετά από μια δόση του εκχυλίσματος σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης (16 mmol/L).²⁷²

Η διμεθοξυφλαβόνη γιαρανόλη, η οποία απομονώθηκε από το είδος *Teucrium polium* L. var. *gnaphalodes* (Lamiaceae), επέδειξε αξιοσημείωτη ανασταλτική δράση έναντι του ενζύμου τυροσινάση (μανιταριού) με τιμή IC₅₀=0.04 mM, συγκρίσιμη με αυτή του πρότυπου αναστολέα (kojic acid)²⁷¹. Επίσης είδη του γένους εμφανίζουν *αντιμυκητιασική, αντική και αντιμικροβιακή δράση* έναντι στελεχών όπως το *Staphylococcus aureus*²⁷³. Συγκεκριμένα μεταβολίτες που απομονώθηκαν από το είδος *Teucrium polium* ανέστειλαν το σχηματισμό βιοφιλμ που αναπτύσσεται από τον *Staphylococcus aureus*. Μεταξύ αυτών υπήρχαν σεσκιτερπενοειδή, τα οποία δεν παρουσίασαν σημαντική δράση, σε αντίθεση με γλυκοσίδες φαινυλπροπανοειδών όπως ο πολουμοσίδης, οι οποίοι ήταν δραστικοί.

Επιπροσθέτως σε *in vivo* μελέτη διαπιστώθηκε η ικανότητα βελτίωσης της μνήμης και της μάθησης σε μύες και η επιδιόρθωση κενών μνήμης σε διαβητικού μύες οι οποίοι λάμβαναν *T. polium* υπό τη μορφή αφεψήματος.

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 7 είδη του γένους *Teucrium* από τα 9 που είναι ευρέως εξαπλωμένα στα Βαλκάνια, (*T. scordioides*, *T. scordium*, *T. chamaedrys*, *T. polium*, *T. montanum*, *T. arduini*, *T. botrys*) αξιολογήθηκε η δραστικότητά τους εναντίον 4 διαφορετικών καρκινικών σειρών (HeLa, Fem-x, K562, MDA-MB-361). Τα εκχυλίσματα των 7 ειδών εμφάνισαν δοσοεξαρτώμενη κυτταροτοξικότητα. Τα υψηλότερα ποσοστά κυτταροτοξικότητας σημειώθηκαν στη σειρά K562 της λευχαιμίας, ιδιαιτέρως από τα μεθανολικά εκχυλίσματα των *T. scordioides*, *T. montanum* και *T. botrys*. Είναι αναγκαίο να τονισθεί ότι τα εκχυλίσματα των *T. scordioides* και *T. montanum* επέδειξαν αξιοσημείωτη εκλεκτικότητα στην κυτταροτοξική τους δράση, εναντίον των K562 κυττάρων σε σχέση τη φυσιολογική σειρά PBMC²⁷⁴. Το μεθανολικό εκχύλισμα του *T. polium* προκάλεσε ενίσχυση της δράσης εγκεκριμένων χημειοθεραπευτικών, όπως η βινκριστίνη, η βινπ्लाστίνη και η δοξορουβικίνη στις καρκινικές σειρές Skmel-3, Saos-2, SW480, MCF-7, KB, EJ και A431²⁷⁵. Η αντι-ογκογόνος δράση του *T. bicolor* έχει αναφερθεί.

Συμπληρώματα διατροφής τα οποία περιέχουν τερπενοειδή έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση σοβαρής και κάποιες φορές θανάσιμης *ηπατοτοξικότητας*. Το *Teucrium polium* αποτέλεσε ένα από τα πρώτα φυτικά προϊόντα που συνδέθηκε με περιπτώσεις οξείας ηπατικής

βλάβης. Παρόμοια φαινόμενα ηπατοτοξικότητας έχουν παρατηρηθεί και με άλλα είδη του γένους. Η ουσία τεουκρίνη Α (teucrin A) φαίνεται να είναι υπεύθυνη για αυτά τα περιστατικά. Ιστοπαθολογικές και βιοχημικές μελέτες αποκάλυψαν ότι υψηλές δόσεις ή μακρόχρονη χορήγηση εκχυλισμάτων από φυτικά είδη του γένους *Teucrium* είναι δυνατό να προκαλέσουν προοδευτική βλάβη του νευρομυϊκού συντονισμού και αναστρέψιμη ή μη αναστρέψιμη ηπατική βλάβη. Η επαγόμενη από τη λήψη φαρμάκων ηπατοτοξικότητα που προκαλείται από φαρμακευτικά φυτά σπάνια αναφέρεται. Ωστόσο στην περίπτωση του *Teucrium* δεν είναι λίγες αυτές οι περιπτώσεις. Πολλοί από τους ασθενείς εμφάνισαν πολύ υψηλά επίπεδα ηπατικών αμινοτρανσφερασών ή ανέπτυξαν ίκτερο. Η ηπατίτιδα και η ενδοηπατική χολόσταση αποτέλεσαν τις αιτίες της ηπατικής καταστροφής²⁷².

12.3 Πειραματικό Μέρος

12.3.1 Εκχυλίσεις και Έλεγχος χημικού φορτίου ολικών εκχυλισμάτων

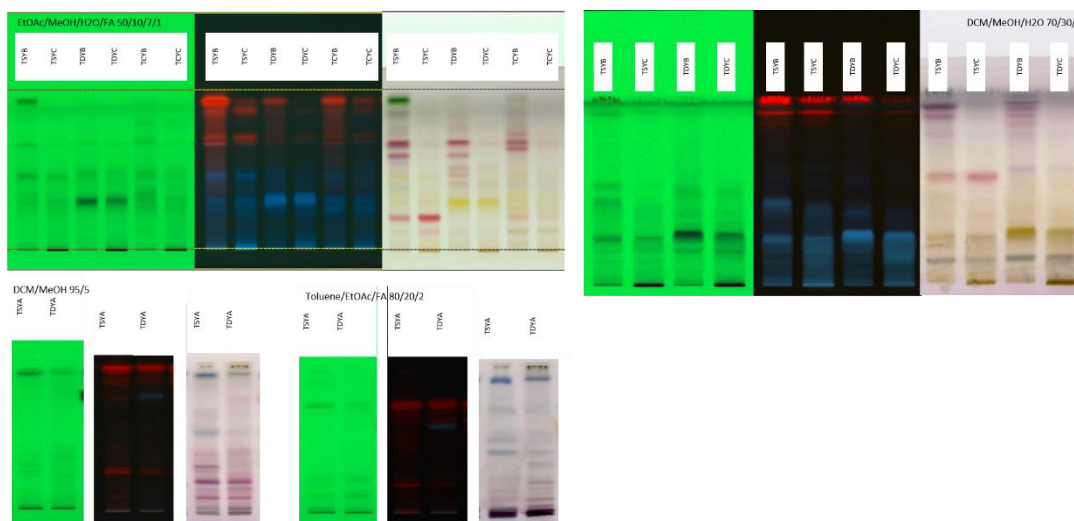
Για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης συλλέχθηκαν τρία είδη του γένους *Teucrium*, το *Teucrium capitatum* (*T. polium*), το *T. scordium* και το *T. divaricatum* ssp. *divaricatum*, τα εκχυλίσματα των οποίων συγκρίθηκαν φυτοχημικά και βιολογικά προκειμένου να επιλεγεί το περισσότερο ενδιαφέρον για φυτοχημική μελέτη. Τα υπέργεια τμήματα του *Teucrium capitatum* και του *T. divaricatum* ssp. *divaricatum* συλλέχθηκαν στις 20.05.2015, από ακαλλιέργητο ελαιώνα κοντά στην Πανεπιστιμιούπολη Ζωγράφου. Τα υπέργεια τμήματα του *T. scordium* συλλέχθηκαν στις 24.05.2015 από την Κύμη Ευβοίας, σε υψόμετρο 200m, κοντά στην περιοχή 'Plantanehof'. Ακολούθησε η ξήρανση των συλλεχθέντων υπέργειων τμημάτων σε χώρο ξηρό, καλά αεριζόμενο και σκοτεινό. Μετά την απομάκρυνση της υγρασίας, το ξηρό φυτικό υλικό κονιοποιήθηκε. Τα φυτικά υλικά εκχυλίστηκαν με τη χρήση υπερέλαιων χρησιμοποιώντας διαδοχικά διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας, διχλωρομεθάνιο (DCM), αιθανόλη (EtOH) και αιθανόλη:νερό 50:50 (EtOH:H₂O 50:50). Για κάθε σύστημα διαλυτών πραγματοποιήθηκαν 2 κύκλοι εκχύλισης, διάρκειας 30 λεπτών ο καθένας, αποφεύγοντας τη θέρμανση του υλικού (σταθερή θερμοκρασία 20-25 °C). Στην περίπτωση παρασκευής υδραλκοολικών εκχυλισμάτων παρατάθηκε η διαβροχή του υλικού (δεύτερος κύκλος) για 12h προκειμένου να γίνει δυνατή η εξαντλητική παραλαβή των συστατικών. Οι διαλύτες εκχύλισης απομακρύνονταν κάθε φορά με τη χρήση Rotavapor ή λυοφιλοποίησης όπου υπήρχε νερό και τα ξηρά εκχυλίσματα αποθηκεύθηκαν σε σκουρόχρωμα φιαλίδια. Στις περιπτώσεις των *Teucrium capitatum* και *T. divaricatum* ssp. *divaricatum* τα βάρη

των ξηρών δρογών που εκχυλίστηκαν ήταν 50 g ενώ στο *T. scordium* 18.5 g. Οι αποδόσεις των εκχυλίσεων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 49. Αποδόσεις εκχυλίσεων ειδών του γένους *Teucrium*

Φυτικό είδος	Διαλύτης εκχύλισης	Κωδικός εκχυλίσματος	Βάρος εκχυλίσματος	Απόδοση εκχύλισης
<i>Teucrium capitatum</i>	DCM	TCYA	1.0612 g	2.12%
<i>Teucrium capitatum</i>	EtOH	TCYB	2.5059 g	5.01%
<i>Teucrium capitatum</i>	EtOH/H ₂ O 50:50	TCYC	4.3929 g	8.78%
<i>Teucrium divaricatum ssp. divaricatum</i>	DCM	TDYA	0.7186 g	1.44%
<i>Teucrium divaricatum ssp. divaricatum</i>	EtOH	TDYB	2.9520 g	5.90%
<i>Teucrium divaricatum ssp. divaricatum</i>	EtOH/H ₂ O 50:50	TDYC	6.8608 g	13.72%
<i>Teucrium scordium</i>	DCM	TSYA	0.2842	1.54%
<i>Teucrium scordium</i>	EtOH	TSYB	1.1616	6.28%
<i>Teucrium scordium</i>	EtOH/H ₂ O 50:50	TSYC	2.4000	12.97%

Το χημικό φορτίο όλων των παραληφθέντων εκχυλισμάτων ελέγχθηκε με υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας (LC-MS) (βλ. παράρτημα) και με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) όπως φαίνεται παρακάτω:

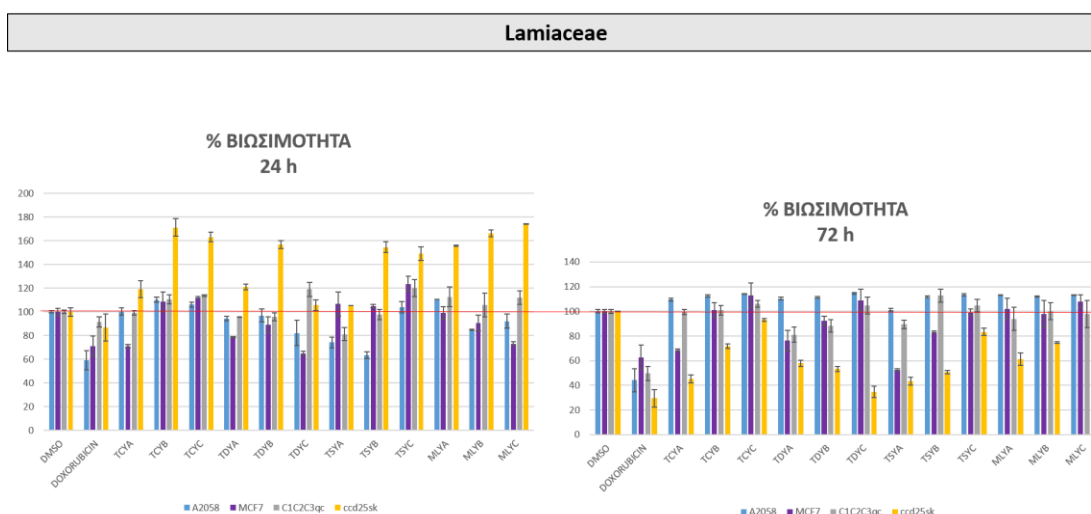


Εικόνα 133. Χρωματογραφήματα HPTLC των εκχυλισμάτων του γένους *Teucrium* σε συστήματα ανάπτυξης Toluene/EtOAc/FA 80/20/2, DCM/MeOH 95/5 για τα άπολα εκχυλίσματα και EtOAc/MeOH/ H₂O/FA 50/10/7/1 και DCM/MeOH/H₂O 70/30/4 για τα πολικά εκχυλίσματα. Επάνω: πολικά εκχυλίσματα Κάτω: άπολα εκχυλίσματα

12.3.2 Βιολογική αξιολόγηση ολικών εκχυλισμάτων

Όπως έχει αναφερθεί στη γενικότερη ενότητα της βιολογικής αξιολόγησης των εκχυλισμάτων τα πολικά εκχυλίσματα των ειδών της οικογένειας Lamiaceae παρουσίασαν τα υψηλότερα ποσοστά εξουδετέρωσης της ελεύθερης ρίζας DPPH (σε συγκέντρωση 200 µg/mL), όπως π.χ. *Teucrium capitatum* (TCYB: 80.48 ± 1.56%, TCYC: 66.97 ± 2.56%), *Teucrium divaricatum* ssp. *divaricatum* (TDYB: 93.17 ± 0.41%, TDYC: 88.82 ± 0.32%) και *Teucrium scordium* (TSYB: 69.75 ± 2.12%, TSYC: 78.02 ± 3.21%). Επίσης όσα εκχυλίσματα της οικογένειας Lamiaceae ελέγχθηκαν στη δοκιμασία αναστολής της AChE με τη μέθοδο NA-FBB, εμφάνισαν σημαντική αναστολή, όπως το μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (ONUYB: 91.69 ± 1.21%), το μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων της *Satureja thymbra* (STYB: 95.63 ± 2.10%), το αιθανολικό και το υδατοαιθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων της *Mentha longifolia* (MLYB: 92.69 ± 0.82 και MLYC: 96.56 ± 0.16), το αιθανολικό και το υδατοαιθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του *Marrubium vulgare* (MVYB: 72.20 ± 1.79% και MVYC: 87.57 ± 0.43) και το μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του *Marrubium velutinum* ssp. *velutinum* (MVVYB: 87.25 ± 2.50%).

Τα αποτελέσματα των ελέγχων κυτταροτοξικότητας παρουσιάζονται στο παρακάτω ραβδόγραμμα:



Εικόνα 134. Επίδραση των εκχυλισμάτων της οικογένειας Lamiaceae στη βιωσιμότητα των κυτάρων A2058, MCF7, C1C2C3qc και ccd25sk συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα, δηλαδή την ομάδα των κυτάρων που επώαστηκαν με 0,2% DMSO. Τα κύτταρα επώαστηκαν με τα εκχυλίσματα (συγκέντρωση 250 µg/mL) για 24 και 72 ώρες προτού εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. Οι αριθμοί των κυτάρων παρουσιάζονται ως % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± SEM. Ως πρότυπη ουσία χρησιμοποιήθηκε η δοξορουβικίνη.

Στις δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας ελέγχθηκαν τα εκχυλίσματα των *Teucrium capitatum*, *Teucrium divaricatum* ssp. *divaricatum*, *Teucrium scordium* και *Mentha longifolia* από την οικογένεια Lamiaceae. Κανένα από αυτά δεν ήταν ιδιαίτερα δραστικό ενώ είχαν αρκετά καλή συμπεριφορά στα φυσιολογικά κύτταρα. Στη μέτρηση των 24 ωρών το TCYA και το TDYC ήταν σχετικά τοξικά έναντι των MCF-7, ενώ το TSYA ήταν δραστικό έναντι των C1C2C3qc. Στις 72 ώρες μόνο το TSYA ήταν δραστικό έναντι των MCF-7.

12.3.3 Κλασμάτωση υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος TDYC με φυγόκεντρο χρωματογραφία κατανομής (FCPC)

Μεταξύ των εκχυλισμάτων του γένους *Teucrium*, το υδατοαλκοολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του είδους *Teucrium divaricatum* ssp. *divaricatum* (Κωδικός εκχυλίσματος: TDYC) ήταν αυτό που μελετήθηκε φυτοχημικά και φαρμακολογικά καθώς οι βιβλιογραφικές αναφορές που αφορούν το είδος είναι περιορισμένες σε αριθμό, παρουσιάζει ενδιαφέρον προφίλ δευτερογενών μεταβολιτών και δε διαφέρει φαρμακολογικά έναντι των εκχυλισμάτων τα οποία προήλθαν από τα άλλα είδη *Teucrium* στους στόχους που μελετήθηκαν.

Πειραματική διαδικασία:

Ποσότητα 13.44 g του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος TDYC κλασματώθηκε με διαδικασία βαθμιδωτής έκλουσης-εξώθησης στην οποία χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός συστημάτων Oka¹⁴³. Τα συστήματα Oka απαρτίζονται από 5 διαλύτες (επτάνιο (Heptane), οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc), βουτανόλη (BuOH), μεθανόλη (MeOH), νερό (H₂O)), ενώ ο συνδυασμός τους είχε προηγουμένως δοκιμασθεί για να ελεγχθεί η καταλληλότητα και η ικανότητα διαχωρισμού των περιεχόμενων μεταβολιτών. Επισημαίνεται ότι μετά το πέρας και της έκτης κινητής φάσης, διοχετεύθηκε στατική φάση προκειμένου να παρασυρθούν τα πιο πολικά συστατικά του εκχυλίσματος και να ολοκληρωθεί ο διαχωρισμός τους. Τα συστήματα έκλουσης και οι συνθήκες του πειράματος φαίνονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 50. Σύστημα βαθμιδωτής έκλουσης για την FCPC κλασμάτωση του εκχυλίσματος TDYC

<u>Σύστημα</u>	Heptane	EtOAc	BuOH	MeOH	H₂O
<u>S1</u>	2.0	4.0	0.0	1.0	5.0
<u>S2</u>	1.0	5.0	0.0	1.0	5.0

S3	1.0	4.5	0.5	1.0	5.0
S4	0.5	4.0	1.5	1.0	5.0
S5	0.5	3.0	2.5	1.0	5.0
S6	0.5	2.0	4.5	1.0	5.0

Πίνακας 51. Συνθήκες FCPC κλασμάτωσης του εκχυλίσματος TDYC

Βάρος εκχυλίσματος	13.44 g
Διαλύτες	Heptane/EtOAc/BuOH/MeOH/H ₂ O
Στροφές	850 rpm
Ροή	7 mL/min
Κινητή φάση	πάνω φάση (οργανική)
Στατική φάση	κάτω φάση (υδατική)
Ρύθμιση	Ascending

Χρησιμοποιήθηκε στήλη 1000 mL. Η εξισορρόπηση του συστήματος πραγματοποιήθηκε στην αναλογία 750mL στατικής φάσης : 250 mL κινητής φάσης. Το εκχύλισμα διαλύθηκε σε μείγμα 50:50 στατικής (κάτω):κινητής (πάνω) φάσης (χρησιμοποιήθηκε loop 30 mL). Συλλέχθηκαν 119 κλάσματα όγκου 50 mL το καθένα, τα οποία συνενώθηκαν σε 50 με βάση το χημικό τους φορτίο μετά την ανάλυση με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας.

Πίνακας 52. Συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν από την FCPC κλασμάτωση του εκχυλίσματος TDYC

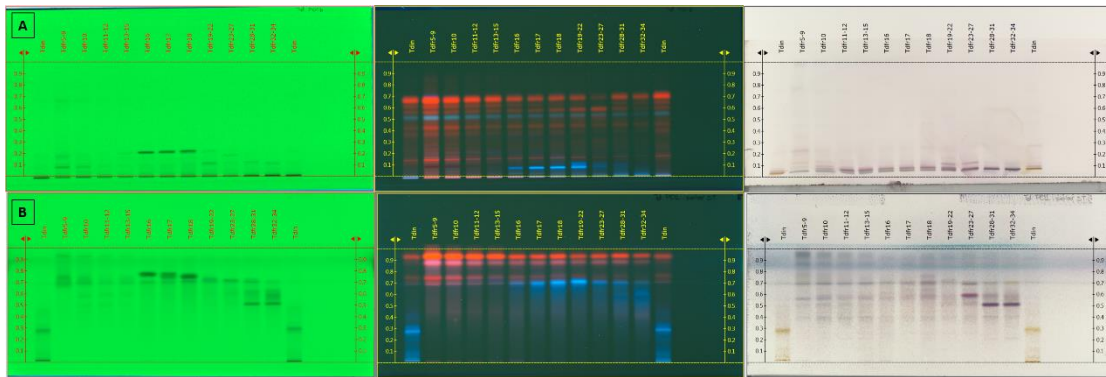
ΚΩΔΙΚΟΣ CPC ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΒΑΡΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ (mg)
T.d. CPC FR4-9	350.7
T.d. CPC FR10	47.3
T.d. CPC FR11-12	116.4
T.d. CPC FR13-15	94.4
T.d. CPC FR16	18.8
T.d. CPC FR17	11.7
T.d. CPC FR18	9.9
T.d. CPC FR19-22	35.1
T.d. CPC FR23-27	51.2
T.d. CPC FR28-31	44.0
T.d. CPC FR32-34	40.1
T.d. CPC FR35-37	40.4
T.d. CPC FR38-40	39.6

T.d. CPC FR41-43	1034.1
T.d. CPC FR44-47	48.8
T.d. CPC FR48-50	45.5
T.d. CPC FR51-53	63.5
T.d. CPC FR54-55	55.1
T.d. CPC FR56-57	56.3
T.d. CPC FR58-60	71.3
T.d. CPC FR61-63	88.7
T.d. CPC FR64	49.3
T.d. CPC FR65	64.3
T.d. CPC FR66	76.1
T.d. CPC FR67	80.3
T.d. CPC FR68	80.7
T.d. CPC FR69	87.7
T.d. CPC FR70-71	213.7
T.d. CPC FR72-73	300.4
T.d. CPC FR74-75	436.4
T.d. CPC FR76	269.4
T.d. CPC FR77	295.1
T.d. CPC FR78	327.9
T.d. CPC FR79	355.5
T.d. CPC FR80	373.3
T.d. CPC FR81	386.0
T.d. CPC FR82	406.7
T.d. CPC FR83	307.3
T.d. CPC FR84	114.1
T.d. CPC FR85-88	246.6
T.d. CPC FR89-90	97.0
T.d. CPC FR91-94	150.1
T.d. CPC FR95-99	150.8
T.d. CPC FR100-104	283.8
T.d. CPC FR105-111	553.4
T.d. CPC FR112-115	353.1
T.d. CPC FR116	2599.4
T.d. CPC FR117	2058.1
T.d. CPC FR118	522.6
T.d. CPC FR119	94.1

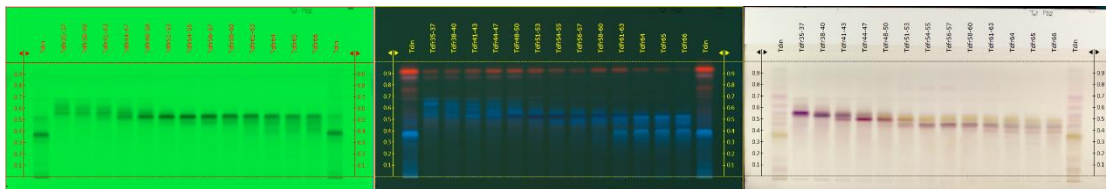
12.3.4 Έλεγχος χημικού φορτίου FCPC κλασμάτων με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC)

Για τον ποιοτικό έλεγχο των συνενωμένων FCPC κλασμάτων που προέκυψαν από το εκχύλισμα TDYC χρησιμοποιήθηκε η τεχνική HPTLC. Τα συστήματα ανάπτυξης, οι συγκεντρώσεις και οι όγκοι των κλασμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην HPTLC ανάλυση προέκυψαν μετά από δοκιμές και αναλύονται ακολούθως.

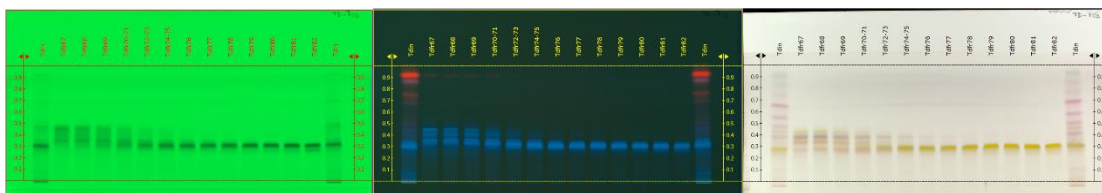
Σε κάθε πλάκα έγινε απόθεση 15 μL από κάθε διάλυμα συνενωμένου κλάσματος συγκέντρωσης 1 mg/mL στον κατάλληλο διαλύτη ή μείγμα διαλυτών. Τα συστήματα ανάπτυξης των πλακών επιλέχθηκαν με τρόπο τέτοιο ώστε να είναι δυνατή η παρατήρηση του μεγαλύτερου ποσοστού των μεταβολιτών που περιέχονται στο εκάστοτε κλάσμα. Οι ανεπτυγμένες πλάκες παρατηρήθηκαν και φωτογραφήθηκαν στα μήκη κύματος 254 και 366 nm, ενώ μετά τη σάρωση των χρωματογραφημάτων και τη λήψη των φασμάτων απορρόφησης στα μήκη κύματος 200, 254, 280 και 366 nm, πραγματοποιήθηκε η εμβάπτιση των πλακών σε διάλυμα θειικής βανιλίνης. Παρακάτω παρουσιάζονται οι πλάκες TLC των κλασμάτων.



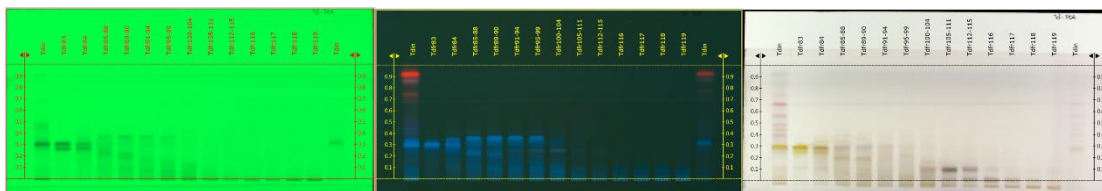
Εικόνα 135. TDYC-P01 A) Toluene/EtOAc/FA 80/20/2 B) EtOAc:MeOH:H₂O:FA 50:10:7:1-Κλάσματα 5-34 (T_{din}=TDYC)



Εικόνα 136. TDYC-P02 (EtOAc:MeOH:H₂O:FA 50:10:7:1)-Κλάσματα 35-66 (T_{din}=TDYC)



Εικόνα 137. TDYC-P03 (EtOAc:MeOH:H₂O:FA 50:10:7:1)-κλάσματα 67-82 (T_{din}=TDYC)

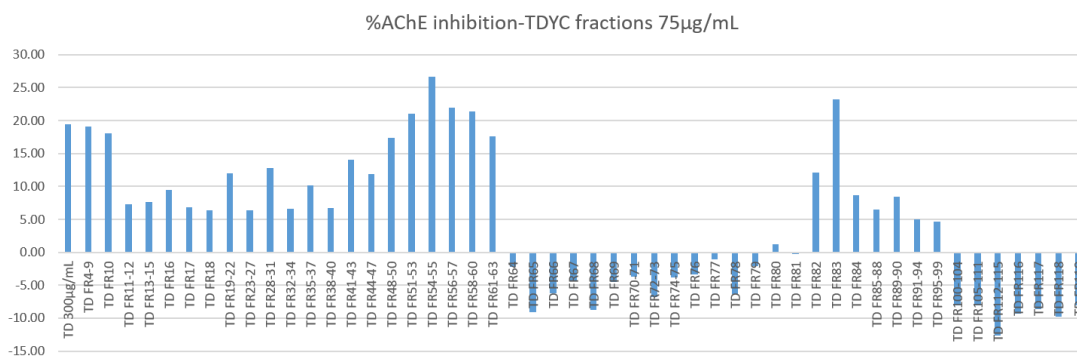


Εικόνα 138. TDYC-P04 (EtOAc:MeOH:H₂O:FA 50:10:7:1)-κλάσματα 83-119 (T_{din}=TDYC)

12.3.5 Βιολογική αξιολόγηση των FCPC κλασμάτων

○ *In vitro* έλεγχος ικανότητας αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης (Μέθοδος Ellman's)

Το εκχύλισμα TDYC ελέγχθηκε στα 300 μg/mL και τα κλάσματα που προέκυψαν από την επεξεργασία του με την τεχνική FCPC στα 75 μg/mL, ως προς την ικανότητα αναστολής της AChE. Ως πρότυπος αναστολέας χρησιμοποιήθηκε η ουσία γαλανταμίνη σε συγκέντρωση 1.36 μM, με την οποία προκαλείται αναστολή της AChE σε ποσοστό 40.00 ± 1.1%. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω ραβδόγραμμα.



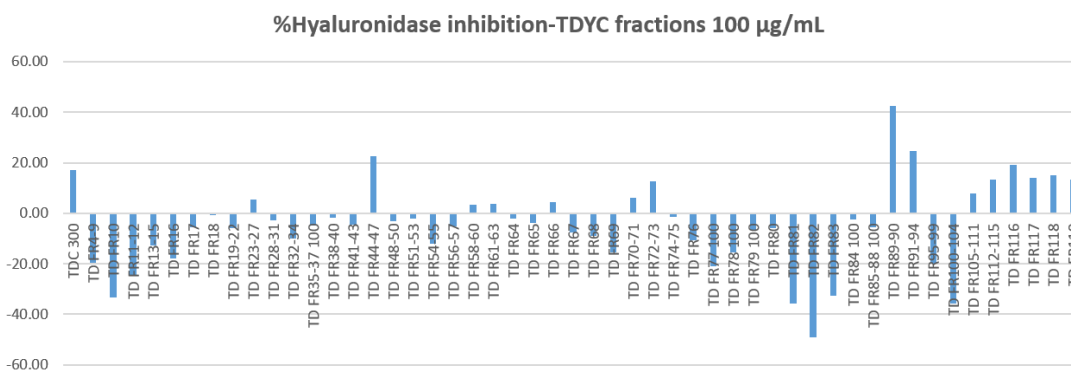
Εικόνα 139. Ραβδόγραμμα %αναστολής της AChE του εκχυλίσματος TDYC (υδραλκολικό εκχύλισμα του *Teucrium divaricatum* ssp. *divaricatum*) σε συγκέντρωση 300 μg/mL και των FCPC κλασμάτων του σε συγκέντρωση 75 μg/mL. Η γαλανταμίνη χρησιμοποιήθηκε ως γνωστός πρότυπος αναστολέας της AChE σε συγκέντρωση 1.36 μM. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως η μέση τιμή τριών επαναλήψεων της μέτρησης του δείγματος.

Το ολικό εκχύλισμα TDYC επιδεικνύει χαμηλή δραστηριότητα στη δοκιμασία αναστολής της AChE με τη μέθοδο Ellman's, καθώς στα 300 μg/mL προκαλεί ~20% αναστολή της AChE, κάτι που επιβεβαιώνεται βιβλιογραφικά²⁷⁶. Σημαντικά αποτελέσματα παρατηρούνται στα αρχικά

κλάσματα (TD FR.4-9 – TD FR.61-63), π.χ. TD FR.4-9: 19.07%, TD FR.10: 18.03%, TD FR.54-55: 26.61%. Από το κλάσμα TD FR.64 έως το TD FR.81 δεν σημειώνεται κάποια αξιοσημείωτη δράση. Από το κλάσμα TD FR.82 έως το TD FR.95-99 παρατηρούνται ποσοστά αναστολής από 4.69% (TD FR.95-99) έως 23.19% (TD FR.83).

○ *In vitro* έλεγχος ικανότητας αναστολής της υαλουρονιδάσης

Το εκχύλισμα TDYC ελέγχθηκε σε τελική συγκέντρωση 300 µg/mL και τα κλάσματα που προέκυψαν από αυτό στα 100 µg/mL ως προς την ικανότητα αναστολής της Hyal. Ως πρότυπος αναστολέας χρησιμοποιήθηκε η ουσία ροσμαρινικό οξύ σε συγκέντρωση 400 µM η οποία προκαλεί $91.79 \pm 0.6\%$ αναστολή του ενζύμου. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα.



Εικόνα 140. Ραβδόγραμμα %αναστολής της Hyal του εκχυλίσματος TDYC (υδραλκολικό εκχύλισμα του *Teucrium divaricatum* ssp. *divaricatum*) σε συγκέντρωση 300 µg/mL και των FCPC κλασμάτων του σε συγκέντρωση 100 µg/mL. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως η μέση τιμή τριών επαναλήψεων της μέτρησης του δείγματος.

Στο ραβδόγραμμα φαίνεται ότι το εκχύλισμα προκάλεσε αναστολή της Hyal 17.04% και κανένα από τα κλάσματα που προέκυψαν από την FCPC κλασμάτωσή του δεν παρουσίασε αξιοσημείωτη δράση.

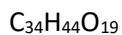
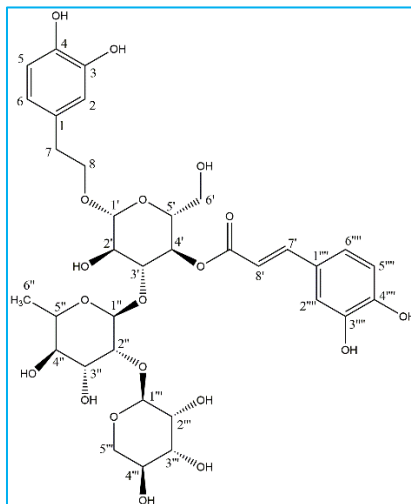
12.3.6 Απομόνωση και ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών

Απευθείας από το FCPC απομονώθηκαν καθαρές οι παρακάτω ουσίες:

1. Τεουκρυσίδης (Td fr.78) (Μεταβολίτης T1)

Ο μεταβολίτης T1 ταυτοποιήθηκε ως ο τεουκρυσίδης με βάση τα φασματοσκοπικά δεδομένα που προέκυψαν από πειράματα 1D και 2D NMR (^1H , COSY, HSQC-DEPT, HMBC), τα

οποία πραγματοποιήθηκαν σε διαλύτη MeOD, και σύγκριση με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας²⁷⁷. Πρόκειται για ένα γλυκοζυλιωμένο φαινυλοπροπανοειδές με μοριακό βάρος 756.707 g/mol.



Πίνακας 53. Φασματοσκοπικά δεδομένα του τεουκρισίδη (MeOD, 600 MHz)

Θέση	$^1\text{H-NMR}$ [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))] (600 MHz)	^{13}C (600 MHz)
Άγλυκο		
1	-	130.41
2	6.73 (1H, d, $J = 1.5$ Hz)	118.00
3	-	145.13
4	-	144.56
5	6.71 (1H, d, $J = 8.1$ Hz)	117.12
6	6.60 (1H, dd, $J = 8.1/1.5$ Hz)	122.06
7	2.83 (2H, m)	36.93
8	4.08 (2H, m)*	72.99
Γλυκόζη		
1'	4.40 (1H, d, $J = 7.7$ Hz)	104.84
2'	3.42 (1H, dd, $J = 9.3/7.7$ Hz)	76.86
3'	3.78 (1H, t, $J = 9.3$ Hz)	82.68
4'	4.95 (1H, t, $J = 9.3$ Hz)	71.51
5'	3.57 (1H, m)*	76.74

6'	(α) 3.57* (1H, m)	(β) 3.66* (1H, m)	62.93
Ραμνόζη			
1''	5.40 (1H, d, $J = 1.4$ Hz)		102.65
2''	3.97 (1H, m)*		80.67
3''	3.71 (1H, dd, $J = 9.2/2.8$ Hz)		72.52
4''	3.29 (1H, t, $J = 9.2$ Hz)		74.74
5''	3.58 (1H, m)		71.02
6''	1.07 (3H, d, $J = 6.2$ Hz)		19.12
Λυξόζη			
1'''	4.91 (1H, d, $J = 3.4$ Hz)		104.85
2'''	3.88 (1H, t, $J = 3.4$ Hz)		72.14
3'''	3.74* (1H, m)		73.49
4'''	3.79* (1H, m)		69.57
5'''	(α) 3.73* (1H, m)	(β) 3.59* (1H, m)	65.44
Καφεοϋλο-υποκαταστάτης			
1''''	-		126.24
2''''	7.09 (1H, d, $J = 2.0$ Hz)		115.12
3''''	-		145.80
4''''	-		147.44
5''''	6.81 (1H, d, $J = 8.2$ Hz)		117.12
6''''	6.99 (1H, dd, $J = 8.2/2.0$ Hz)		123.53
7'	7.62 (1H, d, $J = 15.8$ Hz)		148.69
8'	6.30 (1H, d, $J = 15.8$ Hz)		115.65
COO-	-		167.00

*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη πρωτονίων

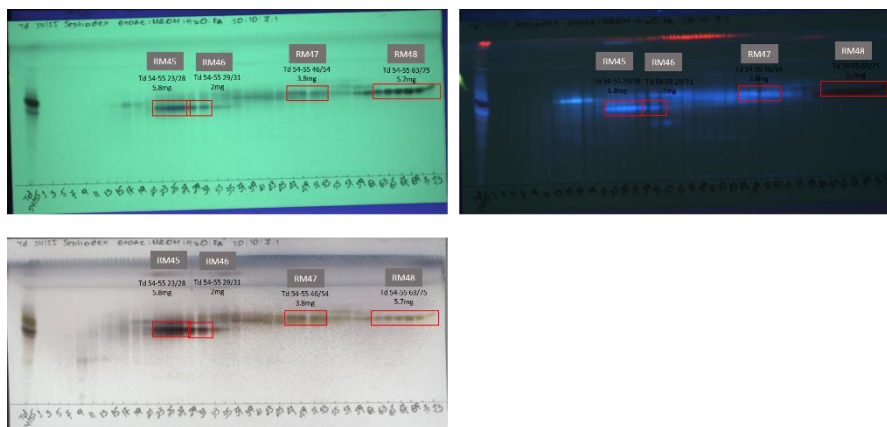
Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ παρατηρούμε τις δύο διπλές κορυφές του trans διπλού δεσμού ($J = 15.8$ Hz) στα 7.62 ppm και 6.30 ppm, οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια 7' και 8' της καφεοϋλο-ομάδας. Επίσης εντοπίζεται το 1,3,4-τρις- υποκατεστημένο σύστημα της ίδιας ομάδας ως εξής: στα 7.09 ppm διπλή κορυφή με $J = 2.0$ Hz, στα 6.99 ppm διπλή διπλών κορυφή με $J = 8.2/2.0$ Hz και στα 6.81 ppm διπλή κορυφή με $J = 8.2$ Hz. Στα 6.73 ppm, 6.71 ppm και 6.60 ppm εμφανίζονται

τα σήματα του 1,3,4-τρις- υποκατεστημένου συστήματος της φαινυλαιθανόλης, ενώ στα 4.08 ppm και 2.83 ppm υπάρχουν οι δύο κορυφές που αντιστοιχούν στα μεθυλενικά πρωτόνια των θέσεων 8 και 7 της ίδιας ομάδας, αντίστοιχα. Το ανωμερικό πρωτόνιο της ραμνόζης εμφανίζεται στα 5.40 ppm ως διπλή κορυφή με $J = 1.4$ Hz και σήμα άνθρακα στα 102.65 ppm, ενώ χαρακτηριστική είναι και η κορυφή του μεθυλίου που εντοπίζεται στα 1.07 ppm ως διπλή κορυφή με $J = 6.2$ Hz και άνθρακα στα 19.12 ppm. Το ανωμερικό πρωτόνιο της λυξόζης εντοπίζεται στα 4.91 ppm ως διπλή κορυφή με $J = 3.4$ Hz και το αντίστοιχο σήμα άνθρακα εμφανίζεται στα 104.85 ppm. Το ανωμερικό πρωτόνιο της γλυκόζης εμφανίζεται στα 4.40 ppm ως διπλή κορυφή με $J = 7.7$ Hz και ο αντίστοιχος άνθρακας στα 104.84 ppm.

Η ουσία απομονώνεται πρώτη φορά από το είδος *Teucrium divaricatum* ssp. *divaricatum*. Η βιβλιογραφία που υπάρχει για τη συγκεκριμένη ουσία είναι περιορισμένη. Έχει προηγουμένως παραληφθεί από τα υπέργεια τμήματα των ειδών *Teucrium chamaedrys*²⁷⁸ και *Teucrium polium*²⁷⁹. Έχει επιδείξει σημαντική αντιφλεγμονώδη δράση μέσω αναστολής της καλσινευρίνης, μιας φωσφατάσης που ενεργοποιεί τα T-λεμφοκύτταρα²⁸⁰ και κυτταροτοξική δράση ενάντια σε διάφορες καρκινικές σειρές όπως είναι η S-180 του σαρκώματος²⁷⁹.

Ορισμένα κλάσματα του εκχυλίσματος TDYC επεξεργάστηκαν περαιτέρω με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού για την απομόνωση των περιεχόμενων ουσιών, όπως φαίνεται ακολούθως:

Κλάσμα TDYC FR.18: 44.2 mg του κλάσματος υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με στατική φάση sephadex LH-20 και κινητή φάση MeOH.



Εικόνα 141. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας των κλασμάτων της *serphadex* στο κλάσμα TDYC FR.18. Σύστημα ανάπτυξης EtOAc/MeOH/H₂O/Formic acid 50/10/7/1

Συνολικά παρελήφθησαν 81 κλάσματα, όγκου 500 μL το καθένα, από τα οποία 4 συνενωμένα κλάσματα ελέγχθησαν για το χημικό τους φορτίο με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

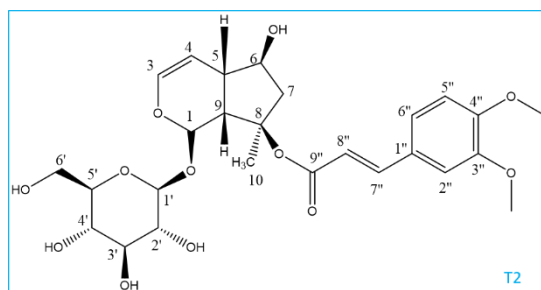
Κωδικός κλάσματος	Κωδικός NMR	Βάρος δείγματος (mg)
Td 54-55 23/28	RM45	5.8
Td 54-55 29/31	RM46	2.0
Td 54-55 46/54	RM47	3.8
Td 54-55 63/75	RM48	5.7

Στα κλάσματα RM45 και RM46 παραλήφθηκε ο 8-*O*-(3,4-διμεθοξυκιναμοϋλο)μυοποροσίδης (Μεταβολίτης T2).

Στο κλάσμα RM47 παραλήφθηκαν ο μαρτινοσίδης (Μεταβολίτης T3) και το παράγωγό του, ο λευκοσεπτοσίδης A (Μεταβολίτης T4).

Στο κλάσμα RM48 εντοπίσθηκε μείγμα 7-*O*-γλυκοσίδη της λουτεολίνης (κυναροσίδης) (Μεταβολίτης T5) και του 3-*O*-γλυκοσίδη της κερκετίνης (ισοκερσιτρίνη) (Μεταβολίτης T6).

Ο μεταβολίτης T2 ταυτοποιήθηκε ως ο 8-*O*-(3,4-διμεθοξυκιναμοϋλο)μυοποροσίδης με τη βοήθεια φασμάτων 1D και 2D NMR σε διαλύτη MeOD.



Πίνακας 54. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 8-O-(3,4-διμεθοξυκιναμοϋλο)μυοσποροσίδη (MeOD, 600 MHz)

Θέση	$^1\text{H-NMR}$ [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]	^{13}C
1	5.95 (1H, d, $J = 1.8$ Hz)	94.52
3	6.23 (1H, dd, $J = 6.4/1.8$ Hz)	141.50
4	4.72 (1H, dd, $J = 6.4/1.8$ Hz)	104.12
5	2.84 (1H, brd, $J = 8.4$ Hz)	41.51
6	4.06 (1H, d, $J = 4.6$ Hz)	76.89
7	(a) 2.28 (1H, d, $J = 14.7$ Hz) (b) 2.17 (1H, dd, $J = 14.7/4.6$ Hz)	48.55
8	-	98.55
9	2.95 (1H, d, $J = 8.3$ Hz)	49.49
10	1.59 (3H, s)	22.55
1'	4.67 (1H, d, $J = 7.8$ Hz)	100.02
2'	3.20 (1H, dd, $J = 9.0/7.8$ Hz)	74.70
3'	3.39*	77.90
4'	3.31*	72.00
5'	3.30*	78.12
6'	(a) 3.92 (1H, dd, $J = 12.2/1.9$ Hz) (b) 3.70 (1H, dd, $J = 12.2/5.7$ Hz)	62.85
1''	-	127.41
2''	7.20 (1H, d, $J = 1.8$ Hz)	111.41
3''	-	149.25
4''	-	150.93
5''	6.97 (1H, d, $J = 8.5$ Hz)	112.70
6''	7.16 (1H, dd, $J = 8.5/1.8$ Hz)	123.81
7''	7.58 (1H, d, $J = 15.9$ Hz)	146.70
8''	6.37 (1H, d, $J = 15.9$ Hz)	117.85

9''	-	167.50
MeO-	3.86 (3H, s)	56.17
MeO-	3.86 (3H, s)	56.17

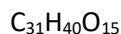
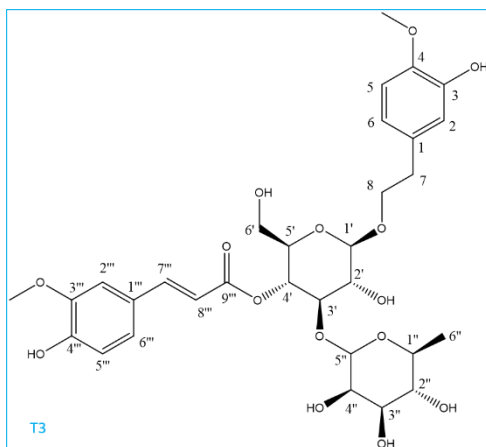
*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη σημάτων

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ παρατηρούμε *trans* διπλό δεσμό στα 7.58 ppm και 6.37 ppm ως διπλές κορυφές με $J = 15.9$ Hz που αντιστοιχούν στα πρωτόνια των θέσεων 7'' και 8''. Τα σήματα των ανθράκων των θέσεων 7'' και 8'' εμφανίζονται στο φάσμα HSQC στα 146.70 ppm και 117.85 ppm. Οι κορυφές των πρωτονίων του αρωματικού δακτυλίου εντοπίζονται στα 7.20 ppm, 7.16 ppm και 6.97 ppm ως ένα ABX σύστημα. Οι 2 μεθοξυ-υποκαταστάτες των θέσεων 3'' και 4'' φαίνονται στα 3.86 ppm ως απλές κορυφές, με σήμα άνθρακα στα 56.17 ppm. Η θέση αυτών των υποκαταστατών γίνεται σαφής μέσω των J^3 συζεύξεων με τα σήματα των πρωτονίων 2'' και 5'' στο φάσμα HMBC. Στα 5.95 ppm φαίνεται το πρωτόνιο της θέσης 1 ως διπλή κορυφή με $J = 1.8$ Hz και στα 6.23 ppm και 4.72 ppm υπάρχουν οι κορυφές των πρωτονίων 3 και 4 του διπλού δεσμού ως διπλές διπλών με $J = 6.4/1.8$ Hz. Στα 2.84 ppm, ως brd με $J = 8.4$ Hz και σήμα άνθρακα στα 41.51 ppm εμφανίζεται το πρωτόνιο της θέσης 5, το οποίο στο φάσμα HMBC έχει J^3 σύζευξη με τον άνθρακα της θέσης 7 (48.55 ppm). Το ανωμερικό πρωτόνιο της γλυκόζης εντοπίζεται στα 4.67 ppm ως d με $J = 7.8$ Hz. Η θέση του σακχάρου γίνεται σαφής από τα σήματα σύζευξης των H-3 (6.23 ppm) και H-9 (2.95 ppm) με τον ανωμερικό άνθρακα του σακχάρου (100.02 ppm) στο φάσμα HMBC. Τέλος στο HMBC φαίνεται σύζευξη J^4 του άνθρακα του καρβονυλίου (167.50 ppm) με τα πρωτόνια του μεθυλίου της θέσης 10

Η ουσία δεν υπάρχει στη βιβλιογραφία. Από το είδος *Teucrium chamaedrys* (μεθανολικά εκχυλίσματα ριζών και φύλλων) έχουν απομονωθεί παράγωγα όπως 6'-(3,4-διμεθοξικιναμοϋλο)αγιουγόλη και 6'-(3,4-διμεθοξικιναμοϋλο)αρπαγίδης, με σημαντική αντιοξειδωτική δράση²⁸¹. Από το *Teucrium orientale* έχουν παραληφθεί ο 8-μεθυλοαρπαγίδης και ο 8-ακετυλοαρπαγίδης²⁸². Παράγωγα της ουσίας όπως ο 8-Ο-φερουλοϋλοαρπαγίδης (φέρει OH στη θέση 5 και ένα μόνο μεθοξύλιο στον αρωματικό δακτύλιο), που έχει απομονωθεί από είδη *Harpagophytum* sp., ρίζες *Scrophularia ningroensis* και *Scrophularia buergeriana* (Scrophulariaceae), έχει επιδείξει νευροπροστατευτική και αντιφλεγμονώδη δράση^{283 284}. Ο μακρανθοσίδης, ο οποίος διαφέρει μόνο στην ύπαρξη OH στη θέση 5, έχει απομονωθεί από το *Stachys macrantha* (Lamiaceae)²⁸⁵. Ο 8-Ο-(E)-*p*-μεθοξικιναμοϋλοαρπαγίδης, που απομονώθηκε από τις ρίζες του *Scrophularia buergeriana*, έχει εμφανίσει σημαντική αντιοξειδωτική,

νευροπροστατευτική και ανασταλτική της AChE δράση²⁸⁴.

Ο μεταβολίτης **T3** ταυτοποιήθηκε ως ο μαρτινσιδής (martynoside) (MW=652.646 g/mol) με τη βοήθεια φασμάτων 1D και 2D (¹H, COSY, HSQC-DEPT, HMBC) NMR φασμάτων σε διαλύτη MeOD και επιβεβαίωση από τη βιβλιογραφία^{286 287}.



Πίνακας 55. Φασματοσκοπικά δεδομένα του μαρτινσιδής (MeOD, 600 MHz)

Θέση	¹ H-NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, <i>J</i> (Hz))]	¹³ C
1	-	129.80
2	6.56 (1H, brs)	115.99
3	-	144.90
4	-	147.15
5	6.66 (1H, d, <i>J</i> = 8.2 Hz)	116.99
6	6.55 (1H, brd, <i>J</i> = 8.2Hz)	121.26
7	2.83 (2H, m)	36.43
8	3.93 (2H, m)	70.90
CH₃O-4	3.92 (3H, s)	55.54
Γλυκόζη		
1'	4.39 (1H, d, <i>J</i> = 7.7 Hz)	103.75
2'	3.30-3.90 (4H, m)	75.90
3'		81.40

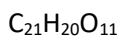
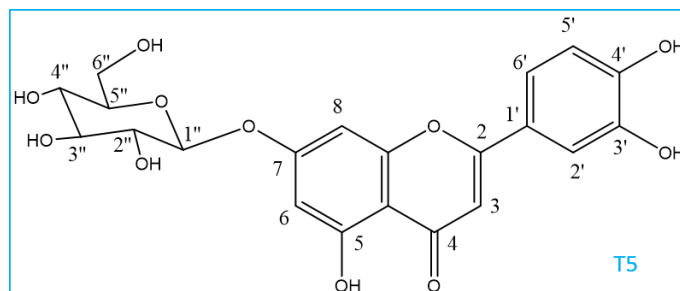
4'		70.30	
5'		76.10	
6'	(α) 3.54 (1H, m)	(β) 3.64 (1H, m)	61.90
Ραμνόζη			
1''	5.42 (1H, d, $J = 1.4$ Hz)		101.54
2''	3.97 (1H, m)		82.14
3''	3.71 (1H, m)		71.94
4''	3.29 (1H, m)		73.80
5''	3.58 (1H, m)		70.60
6''	1.13 (3H, d, $J = 6.2$ Hz)		18.48
Φερουλοΐλο-υποκαταστάτης			
1'''	-		126.47
2'''	7.05 (1H, d, $J = 1.9$ Hz)		115.44
3'''	-		148.05
4'''	-		145.44
5'''	6.77 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)		116.81
6'''	6.94 (1H, dd, $J = 8.0/1.9$ Hz)		123.49
7'''	7.61 (1H, d, $J = 16.0$ Hz)		147.69
8'''	6.28 (1H, d, $J = 16.0$ Hz)		115.01
CH ₃ O- 3'''	3.91 (3H, s)		55.44
COO-	-		168.10

Ο μαρτινοσίδης ανήκει στην κατηγορία των γλυκοζυλιωμένων φαινυλοπροπανοειδών. Τα φάσματα της ουσίας είναι όμοια με αυτά του τεουκροσίδη (T1), με τη διαφορά ότι σε αυτή την περίπτωση δεν υπάρχει λυξόζη και υπάρχουν οι μεθοξυ-υποκαταστάτες στις θέσεις 4 και 3'''.

Ο μεταβολίτης T3 αποτελεί κοινό δευτερογενή μεταβολίτη, ιδιαίτερα για την οικογένεια Lamiales, και έχει παραληφθεί ενδεικτικά από ολόκληρο το φυτό του *Plantago depressa* (Plantaginaceae), από τα υπέργεια τμήματα του *Plantago asiatica*, ολόκληρο το φυτό του *Scrophularia umbrosa*, ολόκληρο το φυτό του *Marrubium vulgare* (Lamiaceae), υπέργεια τμήματα *Salvia viridis*, υπέργεια τμήματα *Marrubium velutinum* κ.ά. Απομονώνεται πρώτη φορά από το

υπέργεια τμήματα *Marrubium velutinum* κ.ά. Ο λευκοσεπτοσίδης έχει παρουσιάσει αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική δράση, αντιφλεγμονώδη σε RAW 264.7 κύτταρα²⁹³ ενώ αυτός και ο βερμπασκοσίδης έχουν επιδείξει ισχυρότερη αναστολή της α-γλυκοσιδάσης σε σύγκριση με τον μαρτινοσίδη²⁹⁰. Σε βιοδοκιμασία αναστολής της τυροσινάσης η ουσία επέδειξε χαμηλή δράση. Έχει εμφανίσει σημαντική αναστολή της πρωτεϊνικής κινάσης C²⁹⁴ και μέτρια αντιβακτηριακή δράση ενάντια στο στέλεχος *Staphylococcus epidermidis*²⁹⁵.

Ο μεταβολίτης **T5** ταυτοποιήθηκε ως ο 7-Ο-γλυκοσίδης της λουτεολίνης (κυναροσίδης) (MW=448.38 g/mol) με τη βοήθεια 1D NMR φάσματος σε διαλύτη MeOD και επιβεβαίωση από τη βιβλιογραφία²⁹⁶.



Πίνακας 56. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 7-Ο-γλυκοσίδη της λουτεολίνης (MeOD, 400 MHz)

Θέση	¹ H-NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]
2	-
3	6.60 (1H, s)
4	-
5	-
6	6.50 (1H, d, J = 1.8 Hz)
7	-
8	6.80 (1H, d, J = 1.8 Hz)
9	-
10	-
1'	-
2'	7.40 (1H, d, J = 1.8 Hz)

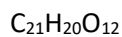
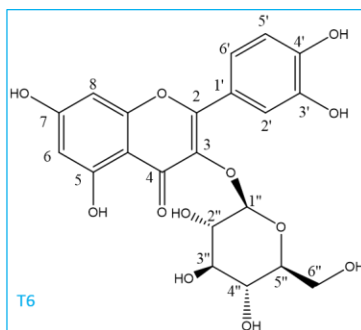
3'	-	
4'	-	
5'	6.90 (1H, d, $J = 8.2$ Hz)	
6'	7.42 (1H, dd, $J = 8.2/1.8$ Hz)	
1''	5.06 (1H, d, $J = 6.4$ Hz)	
2''	3.60-3.35 *	
3''	3.60-3.35 *	
4''	3.60-3.35 *	
5''	3.60-3.35 *	
6''	(α) 3.93 (1H, dd, $J = 12.3/1.7$ Hz)	(β) 3.71 (1H, dd, $J = 12.3/5.9$ Hz)

*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη σημάτων

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές κορυφές ενός γλυκοζυλιωμένου φλαβονοειδούς τύπου κερκετίνης, με τη διαφορά ότι υπάρχει απλή κορυφή στα 6.60 ppm που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 3. Επίσης οι κορυφές των πρωτονίων των θέσεων 6 και 8 εμφανίζονται αρκετά αποθωρακισμένες λόγω της παρουσίας σακχάρου στη θέση 7.

Ο κυναροσίδης απομονώνεται πρώτη φορά από το είδος *Teucrium divaricatum* ssp. *divaricatum* ενώ έχει παραληφθεί από το μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του *Teucrium polium*²⁹⁷ και *Teucrium orientale*²⁹⁸. Αποτελεί κοινό φυτικό μεταβολίτη. Έχει απομονωθεί από είδη όπως *Cynara scolymus* (Compositae), *Chrysanthemum morifolium*, υπέργεια τμήματα *Thymus baicalensis* (Lamiaceae), υπέργεια τμήματα *Rosmarinus officinalis*, υπέργεια τμήματα *Mentha longifolia*, ολόκληρο φυτό *Sedum sarmentosum* (Crassulaceae), *Salvia* spp., *Portulaca oleracea*, *Salix* spp. (Salicaceae), άνθη *Lonicera japonica* (Caprifoliaceae) κ.ά. Εμφανίζει ποικίλες φαρμακολογικές δράσεις *in vitro* όπως αντιφλεγμονώδη, αντι-αποπτωτική, αντιοξειδωτική²⁹⁹, αντιμικροβιακή, αντιδιαβητική³⁰⁰, ηπατοπροστατευτική, νευροπροστατευτική³⁰¹, σπασμολυτική³⁰², ανοσορρυθμιστική³⁰³ κ.ά. *In vivo* έχει επιδείξει υπολιπιδαιμική³⁰⁴, αναλγητική και μέτρια αντιχοληστερολαιμική δράση.

Ο μεταβολίτης **T6** ταυτοποιήθηκε ως ο 3-Ο-γλυκοσίδης της κερκετίνης (ισοκερκετίνη) (MW=464.38 g/mol) με τη βοήθεια 1D NMR φάσματος σε διαλύτη MeOD και επιβεβαίωση από τη βιβλιογραφία³⁰⁵.



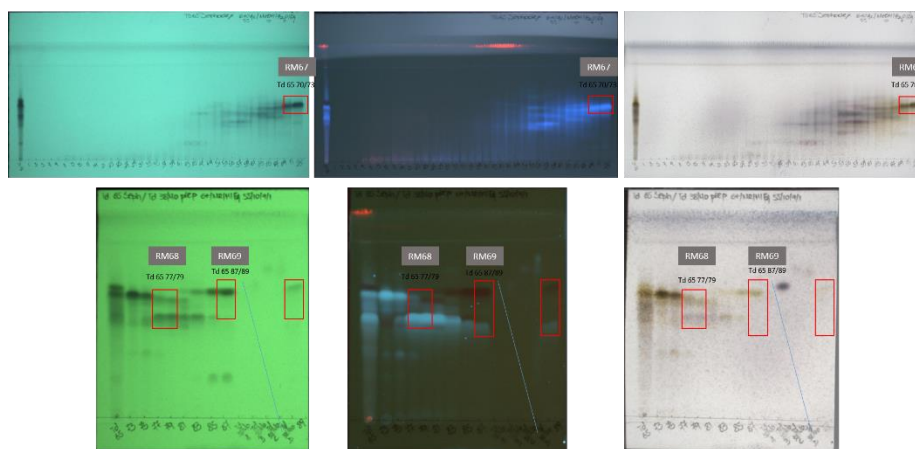
Πίνακας 57. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 3-Ο-γλυκοσίδη της κερκετίνης (MeOD, 400 MHz)

Θέση	$^1\text{H-NMR}$ [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]	
2	-	
3	-	
4	-	
5	-	
6	6.23 (1H, d, $J = 2.1$ Hz)	
7	-	
8	6.43 (1H, d, $J = 2.1$ Hz)	
9	-	
10	-	
1'	-	
2'	7.73 (1H, d, $J = 1.8$ Hz)	
3'	-	
4'	-	
5'	6.85 (1H, d, $J = 8.5$ Hz)	
6'	7.61 (1H, dd, $J = 8.5/1.8$ Hz)	
1''	5.29 (1H, d, $J = 7.7$ Hz)	
2''	3.60-3.35 (4H, m)*	
3''		
4''		
5''		
6''	(α) 3.93 (1H, dd, $J = 12.0/2.0$ Hz)	(β) 3.71 (1H, dd, $J = 12.0/5.1$ Hz)

**Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη σημάτων

Η ισοκερκετίνη είναι ένα αρκετά διαδεδομένο φλαβονοειδές και έχει ανιχνευθεί στο είδος *T. chamaedrys*³⁰⁶. Παραλαμβάνεται από διάφορα φυτικά μέρη, κυρίως υπέργεια τμήματα, και από είδη των οικογενειών Lamiales, Compositae, Verbenaceae, Rosaceae, από τα φύλλα του *Morus alba* κ.ά. Η ουσία έχει μελετηθεί επανειλημμένα ως προς τη φαρμακολογική της αξία καθώς επιδεικνύει ποικίλες δράσεις όπως αντιοξειδωτική, αντινεοπλασματική, αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακή, αναστολή α-γλυκοσιδάσης.

Κλάσμα TDYC FR.65: 51.9 mg του κλάσματος υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με στατική φάση sephadex LH-20 και κινητή φάση MeOH:EtOAc 80:20.



Εικόνα 142. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας των κλασμάτων της sephadex στο κλάσμα TDYC FR.65. Σύστημα ανάπτυξης EtOAc/MeOH/H₂O/Formic acid 50/10/7/1

Συνολικά παρελήφθησαν 90 κλάσματα, όγκου 500 μL το καθένα, από τα οποία 3 συνενωμένα κλάσματα ελέγχθησαν για το χημικό τους φορτίο με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

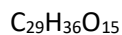
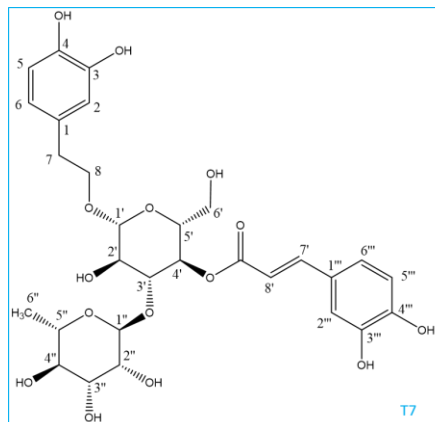
Κωδικός κλάσματος	Κωδικός NMR	Βάρος δείγματος (mg)
Td 65 70/73	RM67	4.2
Td 65 77/79	RM68	1.9
Td 65 87/89	RM69	1.9

Στο κλάσμα RM67 παραλήφθηκε ο ακτεοσίδης (acteoside, verbascoside, kusagin) (Μεταβολίτης T7).

Στο κλάσμα RM68 παραλήφθηκε το χλωρογενικό οξύ (chlorogenic acid) (Μεταβολίτης T8).

Στο κλάσμα RM69 παραλήφθηκε ο κυναροσίδης, ο 7-Ο-γλυκοσίδης της λουτεολίνης (Μεταβολίτης T5).

Ο μεταβολίτης T7 ταυτοποιήθηκε ως ο ακτεοσίδης (βερμπασκοσίδης) (MW=624.59 g/mol) με τη βοήθεια πειράματος ¹H-NMR και επιβεβαίωση από τη βιβλιογραφία³⁰⁷.



Πίνακας 58. Φασματοσκοπικά δεδομένα του ακτεοσίδη (MeOD, 400 MHz)

Θέση	¹ H-NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]	
Άγλυκο		
1	-	
2	6.68 (1H, d, J = 1.6 Hz)	
3	-	
4	-	
5	6.66 (1H, d, J = 8.0 Hz)	
6	6.55 (1H, dd, J = 8.0/1.6 Hz)	
7	2.78 (2H, t, J = 7.2 Hz)	
8	(α) 4.04 (1H, m)	(β) 3.74 (1H, m)
Γλυκόζη		
1'	4.37 (1H, d, J = 7.8 Hz)	
2'	3.40 (1H, dd, J = 9.3/7.8 Hz)	

3'	3.80 (1H, t, $J = 9.3$ Hz)
4'	4.90 (1H, t, $J = 9.3$ Hz)
5'	3.60-3.50 (1H, m)
6'	3.60-3.50 (2H, m)
Ραμνόζη	
1''	5.17 (1H, d, $J = 1.0$ Hz)
2''	3.93 (1H, dd, $J = 3.3/1.0$ Hz)
3''	3.60-3.50 (1H, m)
4''	3.29 (1H, t, $J = 9.3$ Hz)
5''	3.60-3.50 (1H, m)
6''	1.08 (3H, d, $J = 6.0$ Hz)
Καφεούλο-υποκαταστάτης	
1'''	-
2'''	7.04 (1H, d, $J = 1.3$ Hz)
3'''	-
4'''	-
5'''	6.77 (1H, d, $J = 8.1$ Hz)
6'''	6.94 (1H, dd, $J = 8.1/1.3$ Hz)
7'	7.58 (1H, d, $J = 15.9$ Hz)
8'	6.27 (1H, d, $J = 15.9$ Hz)

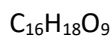
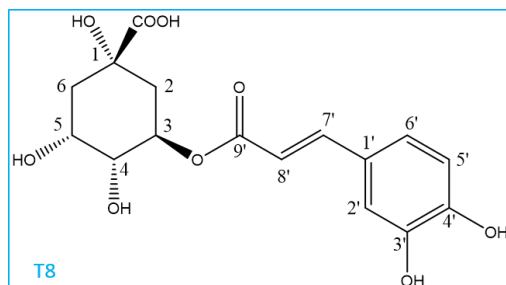
Το φάσμα της ουσίας **T7** είναι όμοιο με αυτό του τεουκρισίδη (**T1**) με τη διαφορά ότι απουσιάζει το τρίτο σάκχαρο, η λυξόζη. Η ουσία ανήκει στα φαινυλαιθανοειδείς γλυκοσίδες, είναι αρκετά διαδεδομένη στο φυτικό βασίλειο, έχει μελετηθεί εκτενώς και έχει επιδείξει σημαντικές και ενδιαφέρουσες φαρμακολογικές δράσεις. Έχει απομονωθεί από το *Teucrium chamaedrys* και από είδη όπως *Verbascum olympicum*, *Ajuga* spp., *Stachys* spp., *Euphrasia* spp., *Olea europaea*, ρίζες *Harpagophytum procumbens* (Pedaliaceae), *Scrophularia* spp., *Marrubium* spp., *Salvia* spp., *Leonurus japonicas* κ.ά. Έχει παρουσιάσει αντιοξειδωτική και αντιυπερτασική δράση³⁰⁸. Η κυτταροτοξικότητα της ουσίας έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής

κοινότητας καθώς ο βερμπασκοσίδης δρα συνεργιστικά με χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, εμφανίζει εκλεκτικότητα, δεν επιδρά τοξικά στα φυσιολογικά κύτταρα και πιθανόν ενισχύει την αντικαρκινική ανοσιακή απόκριση³⁰⁹. Άλλες δράσεις του μεταβολίτη είναι αντιφλεγμονώδης, αντιμικροβιακή, νευροπροστατευτική, αγγειοδιασταλτική, ηπατοπροστατευτική, αντιπαρασιτική, αναστολή τυροσινάσης, ακετυλοχολινεστεράσης, πρωτεϊνικής κινάσης C κ.ά.³¹⁰

311

Ο μεταβολίτης **T8** ταυτοποιήθηκε ως το χλωρογενικό οξύ (5-*O*-trans-caffeoylquinic acid) (MW=354.31 g/mol) με τη βοήθεια ¹H-NMR πειράματος και επιβεβαίωση από τη βιβλιογραφία³¹²

313



Πίνακας 59. Φασματοσκοπικά δεδομένα του χλωρογενικού οξέος (MeOD, 400 MHz)

Πρωτόνιο	¹ H-NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, <i>J</i> (Hz))]
1	-
2	2.25-1.95 (2H, m) *
3	5.33 (1H, m)
4	3.71 (1H, dd, <i>J</i> = 9.8/2.8 Hz)
5	4.16 (1H, m)
6	2.25-1.95 (2H, m) *
1'	-
2'	7.04 (1H, d, <i>J</i> = 1.8 Hz)
3'	-
4'	-
5'	6.77 (1H, d, <i>J</i> = 8.3 Hz)

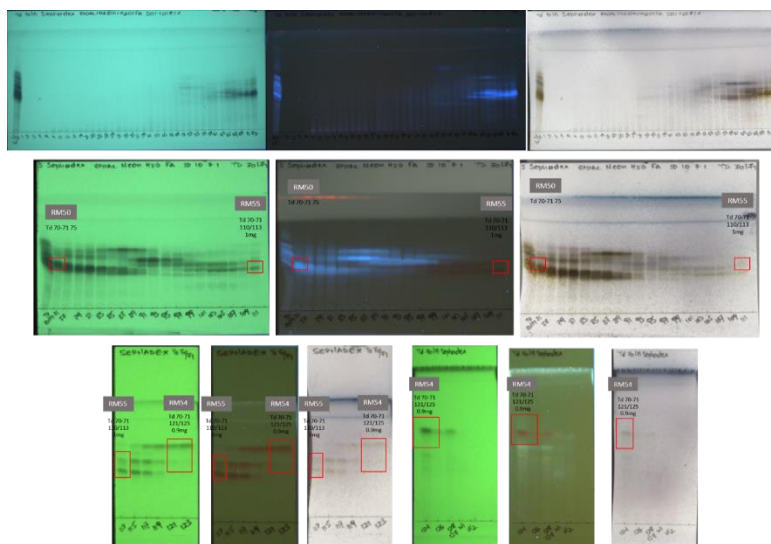
6'	6.95 (1H, dd, $J = 8.3/1.8$ Hz)
7'	7.55 (1H, d, $J = 15.9$ Hz)
8'	6.26 (1H, d, $J = 15.9$ Hz)
9'	-

* Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη σημάτων

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές κορυφές ενός ABX συστήματος και ενός *trans* διπλού δεσμού στην αρωματική περιοχή. Τα πρωτόνια των θέσεων 3, 4 και 5 εμφανίζονται στην οξυγονωμένη περιοχή και συγκεκριμένα στα 5.33, 3.71, 4.16 ppm. Τα τέσσερα πρωτόνια των θέσεων 2 και 6 παρατηρούνται στα 2.05 ppm και 2.19 ppm ως τριπλές κορυφές με $J = 15.4$ Hz.

Το χλωρογενικό οξύ είναι κοινός φυτικός μεταβολίτης. Έχει παραληφθεί από το είδος *Teucrium polium*³¹⁴ και από άλλα φυτικά είδη των οικογενειών Rosaceae (π.χ. *Prunus* sp.), Asteraceae (π.χ. *Artemisia* sp., *Chrysanthemum* sp.), Lamiaceae (π.χ. *Salvia* sp.), Verbenaceae (*Vitex agnus-castus* sp.), Plantaginaceae (π.χ. *Plantago* sp.) κ.ά. Η ουσία έχει ελεγχθεί φαρμακολογικά τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* μελέτες. Έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει τη ρεδοκτάση της αλδόζης, ασκεί νευροπροστατευτική³¹⁵, αντι-νεοπλασματική σε κυτταρικές σειρές όπως η HepG2, η HL-60³¹⁶, αντιφλεγμονώδη, αντιμυκητιασική, ηπατοπροστατευτική, και αντιοξειδωτική δράση.

Κλάσμα TDYC FR.70-71: 201.8 mg του κλάσματος υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με στατική φάση sephadex LH-20 και κινητή φάση MeOH.



Εικόνα 143. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας των κλασμάτων της *sephadex* στο κλάσμα TDYC FR.70-71. Σύστημα ανάπτυξης EtOAc/MeOH/H₂O/Formic acid 50/10/7/1

Συνολικά παρελήφθησαν 128 κλάσματα, όγκου 500 μL το καθένα, από τα οποία 3 συνενωμένα κλάσματα ελέγχθησαν για το χημικό τους φορτίο με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

Κωδικός κλάσματος	Κωδικός NMR	Βάρος δείγματος (mg)
Td 70-71 75	RM50	-
Td 70-71 121/125	RM54	0.9
Td 70-71 110/113	RM55	1.0

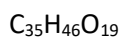
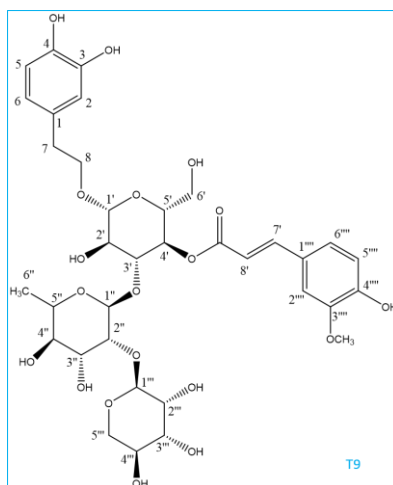
Στο κλάσμα RM50 παραλήφθηκαν οι ουσίες τεουκροσιδής (Μεταβολίτης T1) και ο 3'''-Ο-μεθυλαιθέρας του τεουκροσιδίου ({2-(3,4-dihydroxyphenethyl)-O-α-l-lycoranosyl-(1→2)-α-l-rhamnopyranosyl-(1→3)-4-O-trans-feruloyl-β-d-glucopyranoside}) (Μεταβολίτης T9).

Στο κλάσμα RM54 παραλήφθηκε ο κυναροσίδης, ο 7-Ο-γλυκοσίδης της λουτεολίνης (Μεταβολίτης T5).

Στο κλάσμα RM55 ανιχνεύθηκε σε μείγμα με διάφορες προσμίξεις ο λουτεολινο-7-Ο-β-D-ξυλοσυλο-(1->6)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης.

Ο μεταβολίτης T9 ταυτοποιήθηκε ως ο 3'''-Ο-μεθυλαιθέρας του τεουκροσιδίου με βάση τα φασματοσκοπικά δεδομένα που προέκυψαν από πειράματα 1D και 2D NMR (¹H, COSY-LR), τα οποία πραγματοποιήθηκαν σε διαλύτη MeOD, και εν συνεχεία συγκρίθηκαν και επιβεβαιώθηκαν

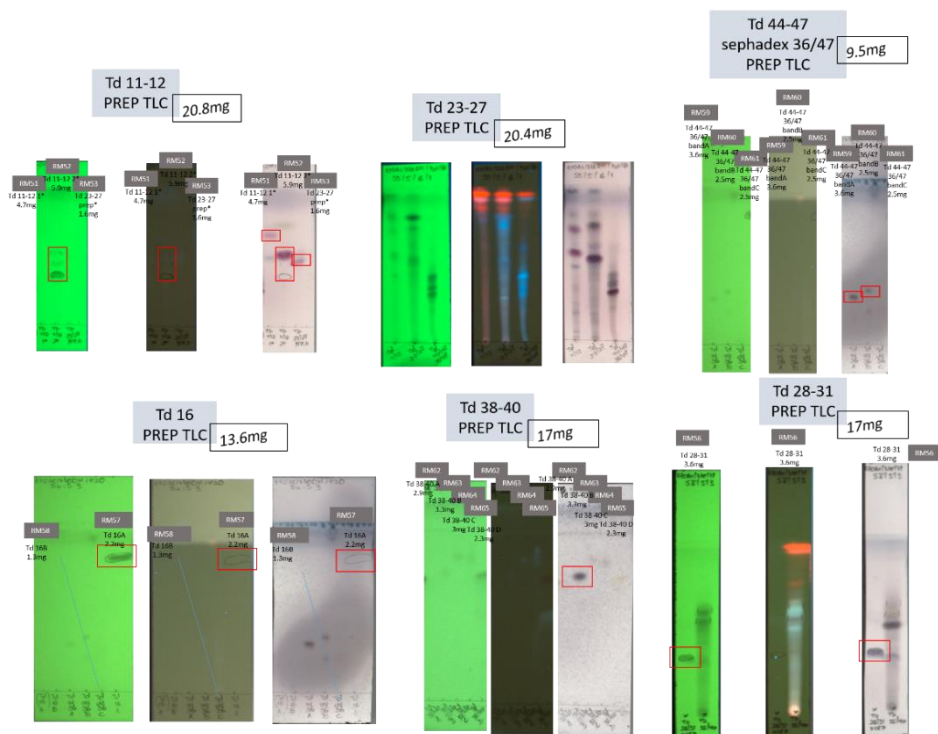
από τη βιβλιογραφία³¹⁷. Πρόκειται για ένα παράγωγο του τεουκραιοσίδου το οποίο φέρει έναν μεθοξυ- υποκαταστάτη (MW=770.739 g/mol).



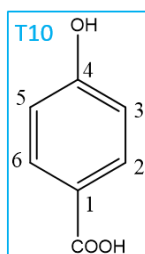
Το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD) της ουσίας είναι πανομοιότυπο με αυτό του τεουκραιοσίδου (Μεταβολίτης T1) με μόνη διαφορά την ύπαρξη της απλής κορυφής του μεθοξυ- υποκαταστάτη στα 3.87 ppm. Ο εντοπισμός της ακριβούς θέσης του μεθοξυλίου έγινε δυνατός μέσω του πειράματος COSY-LR και συγκεκριμένα με την παρατήρηση της σύζευξης των σημάτων των πρωτονίων που εντοπίζονται στα 3.87 ppm και του πρωτονίου στα 7.09 ppm (H-2''').

Η ουσία απομονώνεται πρώτη φορά από το είδος *Teucrium divaricatum* ssp. *divaricatum*. Έχει παραληφθεί από τα υπέργεια τμήματα του είδους *Teucrium chamaedrys*³¹⁷. Δεν υπάρχουν αναφορές για απομόνωση της ουσίας από άλλα είδη και για τη φαρμακολογική της δράση.

Μέσω παρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας στην οποία υποβλήθηκαν ορισμένα κλάσματα του εκχυλίσματος TDYC απομονώθηκαν οι εξής μεταβολίτες:



Ο μεταβολίτης RM57 ταυτοποιήθηκε ως το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ ($MW=138.12 \text{ g/mol}$) (T10) με τη βοήθεια $^1\text{H-NMR}$ πειράματος και επιβεβαίωση από τη βιβλιογραφία³¹⁸.



Πίνακας 60. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος (MeOD, 400 MHz)

Θέση	$^1\text{H-NMR}$ [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]
2/6	7.84 (2H, d, $J = 8.1 \text{ Hz}$)
3/5	6.76 (2H, d, $J = 8.1 \text{ Hz}$)

Το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ είναι κοινός φυτικός μεταβολίτης ενώ έχει παραληφθεί ξανά από είδη *Teucrium*. Οι βιολογικές δράσεις που έχει επιδείξει είναι πολυάριθμες και ποικίλες όπως αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή κ.ά.

12.3.7 Βιολογική αξιολόγηση καθαρών ουσιών

Πίνακας 61. % Ενζυμική αναστολή (AChE Ellman's, AChE NA-FBB, Hyal) των καθαρών απομονωμένων ουσιών του εκχυλίσματος TDYC, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

	AChE Ellman's						AChE NA-FBB	Hyal
	500	100	75	50	5	0.5	100	100
T1	-	28.32 ±1.50	-6.37 ±0.35	12.53 ±1.62	-	-	IC ₅₀ =2.61 ±0.03	1.62 ±2.80
T2	23.63 ±0.07	13.81 ±0.79	-	5.75 ±1.65	11.51 ±0.66	14.78 ±1.42	33.40±2.43	0.29 ±3.43
T3	33.98 ±2.97	16.12 ±4.31	-	10.42 ±2.82	4.27 ±2.92	7.42 ±2.94	88.59±0.05	- 14.24 ±4.88
T5	-	8.18 ±0.99	-	-	-	-	-	20.59 ±5.70
T5	30.98 ±4.42	16.64 ±0.14	-	39.50 ±2.75	6.99 ±0.44	3.28 ±2.01	82.93±1.42	15.65 ±0.95
T6	52.58 ±1.41	9.60 ±0.22	-	6.57 ±1.42	1.35 ±1.01	2.47 ±1.83	95.00±0.30	
T7	-8.90 ±1.15	1.46 ±1.48	-	2.55 ±0.76	2.43 ±0.74	2.53 ±1.47	93.12±0.69	-9.69 ±4.61
T8	39.91 ±0.49	-3.52 ±1.82	-	-8.11 ±2.15	-5.03 ±3.93	0.12 ±2.81	89.51±2.04	-6.60 ±8.39
T9	-	10.23 ±1.88	-	-	-	-	96.69±0.31	
T10								

Ο τεουκρισίδης (T1), ο 8-O-(3,4-διμεθοξικινναμυλο)μυσοποροσίδης (T2), το μείγμα μαρτινοσίδη, λευκοσεπτοσίδη (T3, T4), ο καθαρός κυναροσίδης (T5), το μείγμα κυναροσίδη, ισοκερκετίνης (T5, T6), το χλωρογενικό οξύ (T8), το μείγμα τεουκρισίδη και 3'''-O-μεθυλαιθέρα του τεουκρισίδη (T9) δεν εμφάνισαν σημαντική αναστολή της AChE με τη μέθοδο Ellman's (100

μg/mL: 28.32±1.50%, 13.81±0.79%, 16.12±4.31%, 8.18±0.99%, 16.64±0.14%, 1.46±1.48%, -3.52 ±1.82%). Ο τεουκραιοσίδης (T1), το μείγμα μαρτινιοσίδη, λευκοσεπτοσίδη (T3, T4), το μείγμα κυναροσίδη, ισοκερκετίνης (T5, T6), ο ακτεοσίδης (T7), το χλωρογενικό οξύ (T8), το μείγμα τεουκραιοσίδη και 3'''-Ο-μεθυλαιθέρα του τεουκραιοσίδη (T9) και το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ (T10) έδειξαν ισχυρή δράση με τη μέθοδο NA-FBB (T1: IC₅₀=2.61±0.03 μg/mL, T3, T4:100 μg/mL, 88.59±0.05%, T5, T6:100 μg/mL, 82.93±1.42%, T7:100 μg/mL, 95.00±0.30%, T8:100 μg/mL, 93.12±0.69%, T9:100 μg/mL, 89.51±2.04%, T10:100 μg/mL, 96.69±0.31%).

Στη δοκιμασία αναστολής της Hgal, ο τεουκραιοσίδης (T1), ο 8-Ο-(3,4-διμεθοξυκινναμουόλο)μυσοποροσίδης (T2), το μείγμα μαρτινιοσίδη, λευκοσεπτοσίδη (T3, T4), το μείγμα κυναροσίδη, ισοκερκετίνης (T5, T6), το μείγμα τεουκραιοσίδη και 3'''-Ο-μεθυλαιθέρα του τεουκραιοσίδη (T9) και το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ (T10) δεν επέδειξαν σημαντική αναστολή του ενζύμου.

Ο κυναροσίδης έχει ελεγχθεί για τη δράση του στην υαλουρονιδάση και έχει επιδείξει χαμηλή αναστολή (IC₅₀=695 μM)³¹⁹.

12.4 Συμπεράσματα

Συμπερασματικά πραγματοποιήθηκε η συλλογή διαφόρων ειδών της οικογένειας Lamiales προκειμένου να εξεταστεί η ακρίβεια των εθνοφαρμακολογικών αναφορών που προήλθαν από τα κείμενα του Νικάνδρου, του Ιερόπαιδα και του Διοσκουρίδη. Τα συλλεχθέντα φυτικά είδη εκχυλίστηκαν με διάφορους διαλύτες και αξιολογήθηκαν ως προς τους περιεχόμενους μεταβολίτες αλλά και ως προς την κυτταροτοξική τους δράση και την ικανότητα αναστολής ενζύμων ακετυλοχολινεστεράσης και υαλουρονιδάσης. Το εκχύλισμα TDYC, που προήλθε από τα υπέργεια τμήματα του φυτού *Teucrium divaricatum* ssp. *divaricatum* επιλέχθηκε να μελετηθεί φυτοχημικά και φαρμακολογικά λόγω της ύπαρξης περιορισμένων βιβλιογραφικών αναφορών αλλά και λόγω ενδιαφέροντος χημικού προφίλ. Το εκχύλισμα κλασματώθηκε με την τεχνική CPC και τα ορισμένα από τα κλάσματα επεξεργάστηκαν με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού και παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Έγινε δυνατή η παραλαβή σε μεγάλη ποσότητα, απευθείας από το CPC, του τεουκραιοσίδη. Η ουσία απομονώνεται πρώτη φορά από το συγκεκριμένο είδος. Επίσης απομονώθηκε ένα ιριδοειδές, ο 8-(3,4-διμεθοξυκουμαροόλο)μυσοποροσίδης, φυσικό προϊόν το

οποίο δεν υπάρχει στη βιβλιογραφία. Οκτώ ακόμη μεταβολίτες που ανήκουν στις κατηγορίες των φαινολικών και των γλυκοζυλιωμένων φλαβονοειδών παραλήφθηκαν. Ορισμένοι από αυτούς δεν έχουν παραληφθεί ξανά από το γένος *Teucrium* όπως ο μαρτινοσίδης και ο λευκοσεπτοσίδης. Σε πρόσμιξη με άλλες ουσίες παραλήφθηκε και ο λουτεολινο-7-O-β-D-ξυλοσυλο-(1->6)-β-D-γλυκοκυρανοσίδης. Τέλος όσον αφορά τη βιολογική δράση, ισχυρή αναστολή της AChE με τη μέθοδο NA-FBB εμφάνισαν τα φαινυλοπροπανοειδή. Ο τεουκριοσίδης φαίνεται ότι αναστέλλει ισχυρά την AChE.

12.5 Βιβλιογραφία

268. Tzakou, O. *et al.* Essential Oil Analysis of *Teucrium divaricatum* Heldr . ssp . *divaricatum* Growing in Greece. *Flavour and Fragrance Journal* 12;113-115 (1997).
269. Jaradat, N. A. Review of the taxonomy, ethnobotany, phytochemistry, phytotherapy and phytotoxicity of Germander plant (*Teucrium polium* L.). *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 8 (2015).
270. Galati, E. M., Sanogo, R., Tzakou, O., Rossitto, A. & German, M. P. Antiulcerogenic Activity of *Teucrium divaricatum* ssp. *divaricatum*. *Phytotherapy Research* 11, 572–575 (1997).
271. Boghrati, Z. *et al.* Tyrosinase inhibitory properties of phenylpropanoid glycosides and flavonoids from *Teucrium polium* L . var . *gnaphalodes*. *Iran J Basic Med Sci* 19;804-811 (2016)
272. Ranjbar, S.H., et al A Systematic Review of the Efficacy and Safety of *Teucrium* Species; from Anti-oxidant to Anti-diabetic Effects. *International Journal of Pharmacology* 6(4) (2010)
273. Elmasri, W. A. *et al.* *Teucrium polium* Phenylethanol and Iridoid Glycoside Characterization and Flavonoid Inhibition of Biofilm-Forming *Staphylococcus aureus*. *J Nat Prod.* 78;2-9 (2014).
274. Stanković, M. S., Mitrović, T. L., Matić, I. Z., Topuzović, M. D. & Stamenković, S. M. New Values of *Teucrium* species : in Vitro Study of Cytotoxic Activities of Secondary Metabolites. *Not Bot Horti Agrobo* 43, 41–46 (2015).
275. Rajabalian, S. Methanolic extract of *Teucrium polium* L. potentiates the cytotoxic and apoptotic effects of anticancer drugs of vincristine, vinblastine, and doxorubicin against a panel of cancerous cell lines *Exp Oncol* 30, 133–138 (2008).
276. Vladimir-Knezevic, S., Blazekovic, B., Kindi, M., Vladic, J. et al Acetylcholinesterase Inhibitory, Antioxidant and Phytochemical Properties of Selected Medicinal Plants of the Lamiaceae Family. *Molecules* 19;767–782 (2014). doi:10.3390/molecules19010767
277. Gross, G. A., Lahloub, M. F., Anklin, C., Schulten, H. R. & Sticher, O. Teucroside, a phenylpropanoid glycoside from *Teucrium chamaedrys*. *Phytochemistry* 27, 1459–1463 (1988).
278. Elmastas, M., Erenler, R., Isnac, B., et al Isolation and identification of a new neo-clerodane

diterpenoid from *Teucrium chamaedrys* L. *Natural Product Research : Formerly Natural Product Letters* 30;1-6 (2015). doi:10.1080/14786419.2015.1057583

279. Saracoglu, I., Inque, M., Calis, I. & Ogihara, Y. Studies on constituents with cytotoxic and cytostatic activity of two turkish medicinal plants *Phlomis armeniaca* and *Scutellaria salviifolia*. *Biol. Pharm. Bull.* 18, 1396–1400 (1995).
280. Prescott, T. A. K., Veitch, N. C. & Simmonds, M. S. J. Direct inhibition of calcineurin by caffeoyl phenylethanoid glycosides from *Teucrium chamaedrys* and *Nepeta cataria*. *J. Ethnopharmacol.* 137, 1306–1310 (2011).
281. Pacifico, S. *et al.* Antioxidant efficacy of iridoid and phenylethanoid glycosides from the medicinal plant *Teucrium chamaedrys* in cell-free systems. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 6173–6179 (2009).
282. Kazaz, C., Yildirim, A. & I, A. M. A. V. Antioxidant Activities of the Extracts and Components of *Teucrium orientale* L. var. *orientale*. *Turkish Journal of Chemistry* 30, 483–494 (2006).
283. Kim, S. R. *et al.* Four New Neuroprotective Iridoid Glycosides from *Scrophularia buergeriana* Roots. *J Nat Prod* 65, 1696–1699 (2002).
284. Jeong, E. J., Lee, K. Y., Kim, S. H., Sung, S. H. & Kim, Y. C. Cognitive-enhancing and antioxidant activities of iridoid glycosides from *Scrophularia buergeriana* in scopolamine-treated mice. *Eur J Pharmacol* 588, 78–84 (2008).
285. Calis, I., Basaran, A. A., Saracoglu, I. & Cher, O. S. T. Iridoid and phenylpropanoid glycosides from *Stachys macrantha* *Phytochemistry* 31, 167–169 (1992).
286. Venditti, A. *et al.* Polar constituents, protection against reactive oxygen species, and nutritional value of Chinese artichoke (*Stachys affinis* Bunge). *Food Chemistry* 221, 473-481 (2016). doi:10.1016/j.foodchem.2016.10.096
287. Nishimura, H., Sasaki, H., Inagaki, N., Mitsuhashi, H. Nine phenethyl alcohol glycosides from *Stachys sieboldii*. *Phytochemistry* 30, 965–969 (1991).
288. Yang, B. Y. *et al.* Phenylpropanoids from the fruits of *Nicandra physaloides* and their anti-inflammatory activities. *Nat. Prod. Res.* 31, 2634-2640 (2017).
289. Karioti, A., Protopappa, A. & Skaltsa, H. Identification of tyrosinase inhibitors from *Marrubium velutinum* and *Marrubium cylleneum*. *Bioorg Med Chem* 15, 2708–2714 (2007).
290. Liu, Q. *et al.* Diterpenoids and phenylethanoid glycosides from the roots of *Clerodendrum bungei* and their inhibitory effects against angiotensin converting enzyme and a -glucosidase. *Phytochemistry* 103, 196–202 (2014).
291. Abe, F., Nagao, T. & Okabe, H. Antiproliferative Constituents in Plants 9. Aerial Parts of *Lippia dulcis* and *Lippia canescens*. *Biol Pharm Bull* 25, 920–922 (2002).
292. Miyase, T., *et al* Studies on the Acyl Glycosides from *Leucoseptrum japonicum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 30, 2732-2737 (1982)

293. Han, M., Zhang, X., Zhang, L. & Li, Y. Iridoid and phenylethanol glycosides from *Scrophularia umbrosa* with inhibitory activity on nitric oxide production. *Phytochem. Lett.* 28, 37–41 (2018).
294. Zhou, B. *et al.* Phenylethanoid Glycosides from *Digitalis purpurea* and *Penstemon linarioides* with PKC α -Inhibitory Activity. *J Nat Prod* 61, 1410–1412 (1998).
295. Tasdemir, D. *et al.* Iridoid Glycosides of *Leonurus persicus*. *J Nat Prod* 62, 811–816 (1999).
296. Pan, Z., Fan, G., Yang, R., Luo, W. & Zhou, X. Discriminating *Lamiophlomis rotata* According to Geographical Origin by (1)H-NMR Spectroscopy and Multivariate Analysis. *Phytochem Anal* 26, 247–252 (2015). doi:10.1002/pca.2557
297. Marino, S. De *et al.* Antioxidant activity of phenolic and phenylethanoid glycosides from *Teucrium polium* L. *Food Chem.* 133, 21–28 (2012).
298. Oganesyanyan, G.B. Flavonoids from *Teucrium orientale*. *Chemistry of Natural Compounds* 49, 94–95 (2013).
299. D'Abrosca, B. *et al.* A new acylated flavone glycoside with antioxidant and radical scavenging activities from *Teucrium polium* leaves. *Nat Prod Res* 27, 356–363 (2013).
300. Jang, D. S., Lee, Y. M., Jeong, I. H. & Kim, J. S. Constituents of the Flowers of *Platycodon grandiflorum* with Inhibitory Activity on Advanced Glycation End Products and Rat Lens Aldose Reductase In Vitro. *Arch Pharm Res* 33, 875–880 (2010).
301. Yang, P., Feng, Z., Yang, Y., Jiang, J. & Zhang, P. Neuroprotective Caffeoylquinic Acid Derivatives from the Flowers of *Chrysanthemum morifolium*. *J Nat Prod* 80, 1028–1033 (2016). doi:10.1021/acs.jnatprod.6b01026
302. Maschi, O. *et al.* Inhibition of Human cAMP-Phosphodiesterase as a Mechanism of the Spasmolytic Effect of *Matricaria recutita* L. *J Agric Food Chem* 56, 5015–5020 (2008).
303. Maatouk, M. *et al.* Thermal treatment of luteolin-7-O- β -glucoside improves its immunomodulatory and antioxidant potencies. *Cell Stress and Chaperones* 22, 775–785 (2017). doi:10.1007/s12192-017-0808-7
304. Khushbaktova, Z. A. *et al.* Medicinal plants: Isolation, Chemical Analysis, and Study of the hypolipidemic activity of the total flavonoid extract from *Thermopsis altherniaflora*. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 35, 155–158 (2001).
305. Farooque, S., Rose, P. M., Benohoud, M., Blackburn, R. S. & Rayner, C. M. Enhancing the Potential Exploitation of Food Waste: Extraction, Purification, and Characterization of Renewable Specialty Chemicals from Blackcurrants (*Ribes nigrum* L.). *J. Agric. Food Chem.* 66, 12265–12273 (2018).
306. Vlase, L. *et al.* Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities and Phenolic Profile for *Hyssopus officinalis*, *Ocimum basilicum* and *Teucrium chamaedrys*. *Molecules* 5490–5507 (2014). doi:10.3390/molecules19055490
307. Schlauer, J. *et al.* Acteoside and related phenylethanoid glycosides in *Byblis liniflora* Salisb. plants propagated in vitro and its systematic significance. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 73, 9–15 (2004).

308. Chen, C., Lin, Y., Chien, M., Hou, W. & Hu, M. Antioxidant and antihypertensive activities of acteoside and its analogs. *Botanical Studies* 53, 421-429 (2012).
309. Cheimonidi, C. *et al.* Selective cytotoxicity of the herbal substance acteoside against tumor cells and its mechanistic insights. *Redox Biol.* 16, 169–178 (2018).
310. Lu, J. *et al.* Bioactive Phenylethanoid Glycosides from *Buddleia lindleyana*. *Zeitschrift fur Naturforschung B* 60, 211–214 (2005).
311. Pendota, S. C., Aderogba, M. A., Ndhlala, A. R. & Staden, J. Van. Antimicrobial and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Buddleja salviifolia* (L.) Lam . leaf extracts and isolated compounds. *J. Ethnopharmacol.* 148, 515–520 (2013).
312. Fujita, T. *et al.* In Vitro Antioxidative Effects and Tyrosinase Inhibitory Activities of Seven Hydroxycinnamoyl Derivatives in Green Coffee Beans. *J Agric Food Chem* 52, 4893–4898 (2004). doi:10.1021/jf040048m
313. Hwang, S. H., Kwon, S. H., Kim, S. B. & Lim, S. S. Inhibitory Activities of *Stauntonia hexaphylla* Leaf Constituents on Rat Lens Aldose Reductase and Formation of Advanced Glycation End Products and Antioxidant. *Biomed Res Int* (2017).
314. Milošević-djordjević, O., Jakovljević, M. R. & Marković, A. Polyphenolic contents of *Teucrium polium* L. and *Teucrium scordium* L. associated with their protective effects against MMC-induced chromosomal damage in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Turk J Biol* 42, 152–162 (2018). doi:10.3906/biy-1707-36
315. Yang, P., Feng, Z., Yang, Y., Jiang, J. & Zhang, P. Neuroprotective Caffeoylquinic Acid Derivatives from the Flowers of *Chrysanthemum morifolium*. *J Nat Prod* 80, 1028–1033 (2017). doi:10.1021/acs.jnatprod.6b01026
316. Chen, H. *et al.* Synthesis and antitumor activity of feruloyl and caffeoyl derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24, 4367–4371 (2014).
317. Bedir, E., Manyam, R. & Khan, I. A. Neo-clerodane diterpenoids and phenylethanoid glycosides from *Teucrium chamaedrys* L. *Phytochemistry* 63, 977–983 (2003).
318. Huang, M., Zhong, L., Xie, J., Wang, F. & Zhang, Y. A New Taraxastane-Type Triterpene from *Vitex trifolia* var . *simplicifolia*. *Helvetica Chemica Acta* 96, 2040–2045 (2013).
319. Aoshima, H., Miyase, T. & Warashina, T. Caffeic Acid Oligomers with Hyaluronidase Inhibitory Activity from *Clinopodium gracile*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 60, 499–507 (2012).

13 *Adiantum capillus-veneris* (Pteridaceae)

13.1 Σκοπός

Το είδος *Adiantum capillus-veneris* είναι ένα αρκετά διαδεδομένο θεραπευτικό φυτό στην παραδοσιακή ιατρική. Τόσο ο Νίκανδρος όσο και ο Ιερόπαιδας αναφέρουν τη θεραπευτική χρήση του αδιάντου. Για τους λόγους αυτούς, το φυτό συλλέχθηκε και εκχυλίστηκε. Στόχος ήταν να μελετηθεί το φυτοχημικό του περιεχόμενο και να αξιολογηθεί η παραδοσιακή θεραπευτική χρήση του είδους ως αντίδοτο σε δηγμάτα όφεων αλλά και ως κυτταροτοξικός παράγοντας. Επίσης σημαντική ήταν και η ανεύρεση των πιθανά υπεύθυνων για τη δράση ουσιών.

13.2 Θεωρητικό Μέρος

13.2.1 Αναφορές της δρόγης στα υπό μελέτη κείμενα

Ο Νίκανδρος στους στίχους 837-847 των *Θηριακών* περιγράφει τη θεραπευτική χρήση του αδιάντου έναντι των δηλητηριωδών δηγμάτων.

Νικάνδρος Αρχαίο Κείμενο 837-847

Οἷσιν ἐγὼ τὰ ἕκαστα διείσομαι ἄρκια νοῦσων.
δὴ γὰρ ὄτ' ἀγχοῦσης θριδακηΐδα λάξεο χαιτῆν,
ἄλλοτε πενταπέτηλον, ὄτ' ἄνθεα φοινά βάτιοι,
ἄρκτιον, ὄξαλίδας τε καὶ ὀρμενόνετα λυκαψόν,
κίκαμα τὸρδειλόν τε περιβρυές, ἐν δὲ χαμηλὴν
ρέϊα πίτυν, φηγοῦ τε βαθὺν περί φλοιὸν ἀράξας,
σὺν δ' ἄρα καυκαλίδας τε καὶ ἐκ σταφυλίνου ἀμήσας
σπέρματα καὶ τρεμίθιοιο νέον πολυειδέα καρπόν·
ἢ ἔτι καὶ φοινίσσον ἀλὸς καταβάλλεο φύκος,
ἀχραές τ' **ἀδιάντον**, ἴν' οὐκ ὄμβροιο ῥαγέντος
λεπταλέη πίπτουσα νοτὶς πετάλοισιν ἐφίξει.

Νικάνδρος Μετάφραση 837-847

Για ὅλα, τα παραπάνω ολέθρια, ὅπλα για να 'χεις ν' αμυνθεῖς τώρα
θε να 'στορήσω. Πάρε λοιπὸν βοιδόγλωσσα, οπου τα φύλλα της
με το μαρούλι μοιάζουν, κόψε και το πεντάφυλλο, τα κόκκινα ανθάκια
του ρούβου του θαμνώδη, κολιτσίδα, οξυλάπαθο καθώς και το μανούνη
με τα βλαστάρια τα μακριά, που πα στη γη ακουμπάνε· πάρε
και καυκαλίθρα, τάρδουλο το πολύφυλλο και δωδεκάνθη ακόμα,
χάραξε τη βελανιδιά βαθιά και πάρε τον φλοιό της, βάλε
και μωσχολάχανο, λιώσε και σπόρους αγριοκάροτου, και φρέσκο καρπό της κοκκορεβυθιάς,
που 'ναι τα είδη της πολλά· πάρε και φύκι τελικά της θάλασσας κοκκινωπό και καθαρό
μαλλόχορτο· μη το μαζέψεις με βροχή, αφού τα πεταλάρια του ποτίζονται, νοτίζονται και
χρήσιμα δεν είναι.

Εικόνα 144. Απόσπασμα των Θηριακών όπου αναφέρεται η θεραπευτική χρήση του αδιάντου

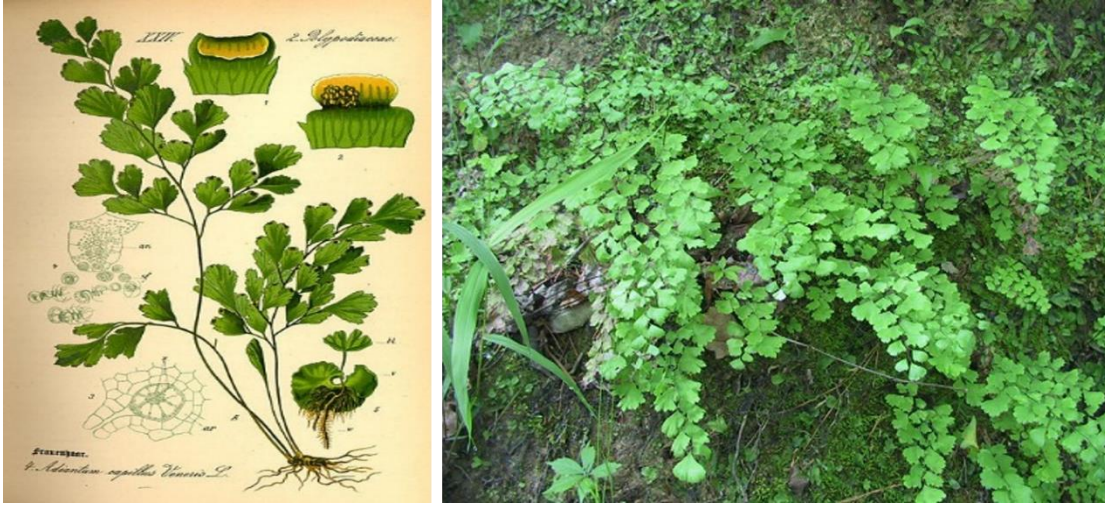
Στο έργο *Περί Υγίης Ιατρικής* ο Διοσκουρίδης, αφού κάνει μια λεπτομερή βοτανική περιγραφή του είδους, επισημαίνει ότι οι ρίζες του δεν έχουν θεραπευτική αξί και προτείνει τη λήψη *per os* αφεψήματος της δρόγης για την αντιμετώπιση προβλημάτων του αναπνευστικού συστήματος, ενώ αναφέρει ότι σε συνδυασμό με κρασί μπορεί να βοηθήσει όσους έχουν υποστεί δήγμα από δηλητηριώδη οργανισμό, ως κατάπλασμα μπορεί να εφαρμοστεί στην περιοχή του δήγματος και τέλος μπορεί να προκαλέσει τη μείωση όγκων.

Ο Ιερόπαιδας προτείνει τη χρήση αδιάντου σε συνδυασμό με σπέρματα σιναπιού για την αντιμετώπιση των σπύλων (...*νάπιος σπέρματα συν αδιάντου αφεψήματι πινόμενον...*).

13.2.2 Δρογοβοτανική-Γεωγραφική εξάπλωση-Βιότοπος

Η **οικογένεια** Pteridaceae αποτελεί την κυριότερη ομάδα των πτεριδόφυτων και χωρίζεται σε 85 γένη (1.226 είδη). Περιλαμβάνει είδη με κοντό ρίζωμα, το οποίο έρπει και συνήθως είναι κονδυλώδες, φολιδωτό, με διάφανα λέπια. Ο μίσχος (πετιόλες) είναι σκούρος και γυαλιστερός, με 2 αγγειώδη σκέλη στη βάση, τα οποία ενώνονται για να σχηματίσουν ένα μεμονωμένο 4-γωνικό σκέλος. Τα φύλλα είναι 1-3-πτεροειδή (πτερόσχιδα). Τα σποριαγγεία αναπτύσσονται πάνω στα φύλλα, συγκεντρωμένα σε σχηματισμούς που ονομάζονται σωροί (Sori), ενώ οι σπόροι είναι τετραεδρικοί.

Το γένος *Adiantum* L. περιλαμβάνει 171 είδη. Στην Ελλάδα συναντάται μόνο το *Adiantum capillus-veneris*. Το ρίζωμα τους είναι αναρριχητικό, φολιδωτό, στενό με καφέ λέπια (scales). Ο μίσχος (πετιόλες) φέρει λέπια μόνο στη βάση, είναι σκούρος και γυαλιστερός. Το (πυρηνικό) έλασμα είναι ευρύ, ποώδες, άτριχο και τα νεύρα ελεύθερα. Τα σποριάγγεια/σωροί (Sori) είναι σε παράλληλες ευθύγραμμες ομάδες των 2-10, στην κατώτερη πλευρά των φυλλαρίων, κατά μήκος και μεταξύ των παράλληλων νεύρων (veins).



Εικόνα 145. *Adiantum capillus-veneris*

Το είδος *Adiantum capillus-veneris* L., *Sp. Pl.* 1096 (1753) (syn. *Adiantum capillus-veneris* L. var. *modestum* (Underw.) Fernald, *Adiantum capillus-veneris* L. var. *protrusum* Fernald, *Adiantum modestum* Underw., *A. michelii*, *A. schaffneri* και *A. tenerum*) αποτελεί μια μικρή (ύψος περίπου 40 cm), πολυετή, ποώδη φτέρη. Είναι ιθαγενές του νότιου μέρους των Ηνωμένων Πολιτειών από την Καλιφόρνια μέχρι τις ακτές του Ατλαντικού, μέσω Μεξικού και Κεντρικής Αμερικής, έως τη Νότια Αμερική. Είναι επίσης ιθαγενές στην Ευρασία, Ανατολική Ασία και Αυστραλία. Εντοπίζεται σε περιοχές με εύκρατο κλίμα από θερμό-εύκρατο έως τροπικό, όπου το ποσοστό υγρασίας είναι υψηλό χωρίς να είναι κορεσμένο, σε υγρή, καλά στραγγισμένη άμμο, χώμα ή ασβεστόλιθο πολλών στελεχών, συμπεριλαμβανομένων τροπικών δασών, θαμνώδεις και δασικές εκτάσεις. Συναντάται σε νωπά πετρώματα, κοντά σε πηγές, σε σχισμές βράχων, σε τοιχώματα πηγαδιών, συχνά σε ασβεστόλιθους, σε υψόμετρο 1-800 m. στη Δυτική και Νότια Ευρώπη. Το ρίζωμα είναι οριζόντιο και καλύπτεται από πυκνά καφέ, στενά, λογχοειδή λέπια. Τα φύλλα είναι σύνθετα, ανοιχτοπράσινα, σύνδεονται χαλαρά με το στέλεχος, έχουν μικρές αποστάσεις μεταξύ τους, με μήκος 10-60 cm, 2- ή 3-πτεροειδή (πτερόσχιδα φύλλα), ωοειδή έως

ωοειδή-λογοχειδή. Ο μίσχος έχει διάμετρο 0.5-1.5 mm και μήκος μέχρι 25 cm όσο το (πυρηνικό) έλασμα, είναι καστανόμαυρος, με λέπια στη βάση, γυαλιστερός, γλιστερός και εύθραυστος ευαίσθητης υφής. Τα τελικά άκρα-ανώτερα τμήματα είναι λεπτά, ελαφρώς γκριζωπά-πράσινα, σφηνοειδή, με κοντό βλαστό και 2-8 ευρείς λοβούς, χωρίς νεύρα και κεντρική νεύρωση. Οι σωροί (sori) εντοπίζονται περιφερειακά στους ακραίους λοβούς και είναι πολλοί σε κάθε λοβό. Οι σπόροι που ωριμάζουν είναι 1-10. Τα δευτερεύοντα φυλλάρια είναι σφηνοειδή, αναπτύσσονται σε τριχοειδές σκέλος, που ποικίλει σε μορφή και μέγεθος. Η ανθοφορία γίνεται από Ιούνιο έως Αύγουστο και η συγκομιδή από τον Μάιο έως Οκτώβριο.

Συστηματική κατάταξη σύμφωνα με το σύστημα που έχει υιοθετήσει το USDA (<https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=ADCA>):

Βασίλειο (Kingdom)	Φυτά (<i>Plantae</i>)
Υποβασίλειο (Subkingdom)	Τραχεόφυτα (<i>Tracheobionta</i>)
Άθροισμα (Division)	Πτεριδόφυτα (<i>Pteridophyta</i>)
Κλάση (Class)	<i>Filicopsida</i>
Τάξη (Order)	<i>Polypodiales</i>
Οικογένεια (Family)	<i>Pteridaceae</i>
Γένος (Genus)	<i>Adiantum</i> L.
Είδος (Species)	<i>Adiantum capillus-veneris</i> L.



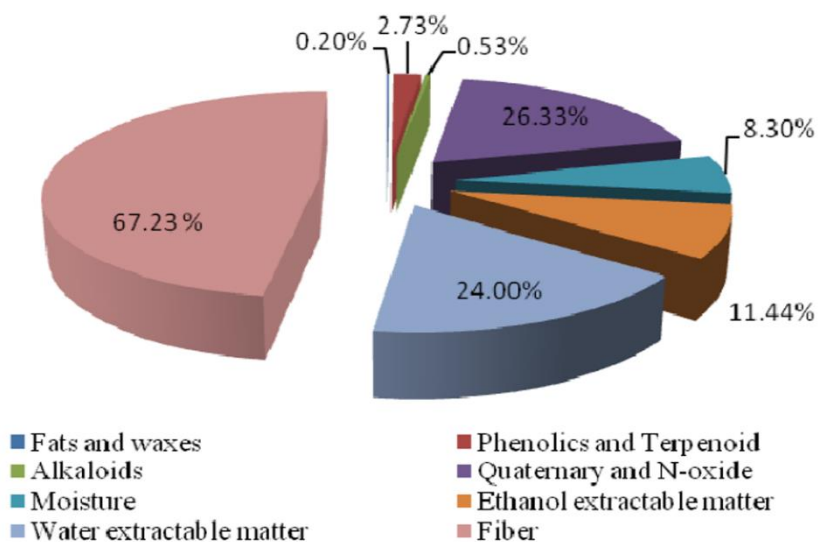
Εικόνα 146. *Adiantum capillus-veneris*

13.2.3 Δρογοϊστορία-Δρογοετυμολογία

Η ονομασία του γένους του βοτάνου *Adiantum capillus-veneris* προέρχεται από το ότι δε μουσκεύεται (α-διάντο=μη υγρανθές) μέσα στο νερό. Το *capillus-veneris* σημαίνει 'κόμη της Αφροδίτης', η οποία σύμφωνα με το μύθο ξεπρόβαλε μέσα από τους αφρούς της θάλασσας με στεγνά μαλλιά. Κοινώς συναντάται με τις εξής ονομασίες: πολυτρίχι, σκορπίδι, σκολοπένδριον, ασπλήνιον, ημιονίτης, καλλίτριχον, μαλλόχορτο, κόμη της Αφροδίτης, βροντοτρίχι, πηγαδόχορτο, ψαλλιδόχορτο, γένεια, φύτσι του νερού, βροντοτρίχι κ.ά.

Ήταν βότανο γνωστό από την αρχαιότητα ως τονωτικό των μαλλιών. Ο Διοσκουρίδης και ο Πλίνιος το χρησιμοποιούσαν εναντίον του άσθματος. Το πολυτρίχι το καταλογίζει ο Θεόκριτος στα φυτά της πηγής του Ύλα. Ο αγαπητός αυτός φίλος του Ηρακλή, στην εκστρατεία των Αργοναυτών, πήγε σε μια βρύση να πάρει νερό, αλλά εκεί τον απήγαγαν οι νύμφες. Ο Ηρακλής ψάχνοντας μάταια να βρει τον Ύλα, δεν πρόφθασε να επιβιβασθεί στην Αργώ. Το πολυτρίχι θεωρούνταν σαν αποτελεσματικό φάρμακο για την τριχόπτωση, ίσως γιατί τα κοτσάνια του μοιάζουν με ανθρώπινες τρίχες.

13.2.4 Δρογοχημεία



Εικόνα 147. Ποσοτική εκτίμηση του περιεχομένου του εκχυλίσματος των φύλλων του *Adiantum capillus-veneris*³²⁰

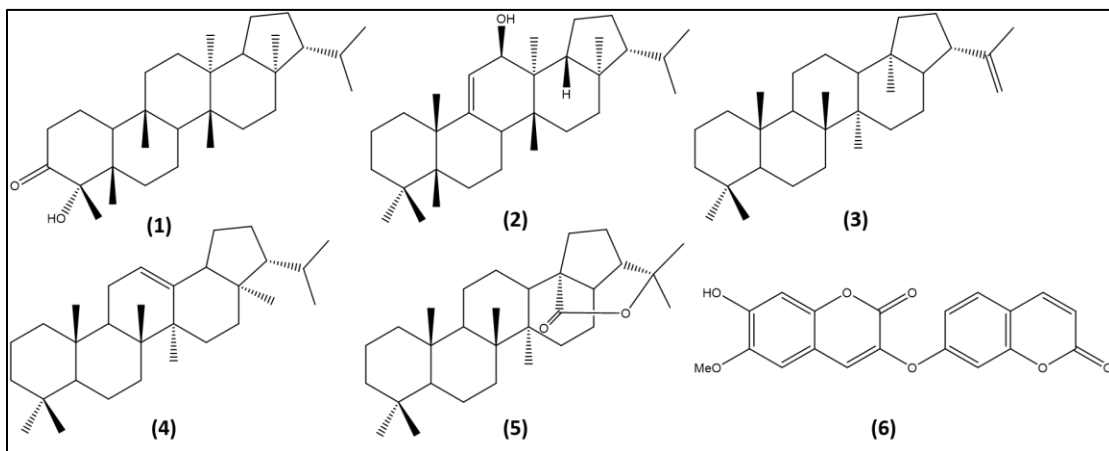
Ένα μεγάλο μέρος των μεταβολιτών της δρόγης ανήκει στην κατηγορία των υδατανθράκων και συγκεκριμένα πρόκειται για γλίσχρομα (1.5-2.7 %, γαλακτουρονικό οξύ,

γαλακτόζη, γλυκόζη, ξυλόζη και ραμνόζη). Λιπίδια και ειδικότερα διακυλογλυκερόλη-O-4'-(N,N,N-τριμεθυλο)-ομοσερίνη (περιέχει παλμιτικό, λινολεϊκό, λινολενικό και αραχιδονικό οξύ) και ένα μείγμα εστέρων, οι οποίοι σαπωνοποιούνται προς οξύ (C₁₆H₃₂O₂) και κετόνη (C₂₅H₄₀O ή C₂₆H₄₂O) συμπεριλαμβάνονται στις ουσίες που ανιχνεύονται στη δρόγη. Το αιθέριο έλαιο, κίτρινου χρώματος, περιέχει 67 συστατικά³²¹. Ανάμεσα σε αυτά, η καρβόνη αποτελεί το κύριο συστατικό (31.58%). Άλλες ουσίες που έχουν ανιχνευθεί είναι η καρβακρόλη (13.75%), εξαδεκανοϊκό οξύ (5.88%), θυμόλη (4.05%), εξαϋδροφαρνεσυλική ακετόνη (3.16%) και η-νονανάλη (2.99%). Από το μεθανολικό εκχύλισμα 37 μεταβολίτες έχουν παραληφθεί με τα κυριότερα μόρια να είναι η 5-(7α-ισοπροπενυλο-4,5-διμεθυλοκταϋδρο-1H-ινδεν-4-υλο)-3-μεθυλο-2-πεντανόλη (24.49%), η-εξαδεκανοϊκό οξύ (18.29%) και γ-σιτοστερόλη (10.61%), σισβαξενικό οξύ (9.25%), 5-7α-ισοπροπενυλο-4,5-διμεθυλο-οκταϋδροϊνδεν-4-υλο)-3-μεθυλο-πεντ-2-όλη (2.63%), τετραδεκανοϊκό οξύ (2.20%) και 9-δωδεκυλο-τετραδεκαϋδρο-φαινανθρένιο (2.15%)³²².

Τα τριτερπένια αποτελούν μια χαρακτηριστική ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών του είδους *Adiantum capillus-veneris*. Περισσότερα από 30 τριτερπένια έχουν ανιχνευθεί, τα οποία εντοπίζονται στα φύλλα και τα περισσότερα ανήκουν στην ομάδα των παραγώγων του χοπανίου και τροποποιημένου χοπανίου, ενώ επίσης απαντώνται παράγωγα του λουπενανίου και του ολεανανίου π.χ. αδιαντόνη, ισοαδιαντόνη, αδιαντοξειδίο, ισοαδιαντόλη, ισοαδιαντόλη-B, 21-υδροξυαδιαντόνη (α κετόλη), αδιαν-5(10)-εν-3α-όλη, αδιαν-5-εν-3α-όλη, 21β-υδροξυ-29-νορ-22-χοπανόνη, 7,9(11) φερναδιένιο, 7-φερνένιο, 3-μεθοξυ-4-υδροξυφιλισάνιο και 3,4-διϋδροξυφιλισάνιο, 3α,4α-εποξυφιλισάνιο, πετρον-14-εν-7α-όλη, φερν-9(11)-εν-3α-όλη, φερν-7-εν-3α-όλη, φερν-9(11)-εν-28-όλη, 4α-υδροξυφιλισαν-3-όνη **(1)**, φερν-9(11)-εν-12β-όλη **(2)**, φερν-9(11)-εν-12-όνη, 28-υδροξυφερν-9(11)-ένιο, φερνα-7,9(11)-διένιο, χοπ-22(29)-ένιο **(3)**, ολεαν-18-εν-3-όνη, ολεαν-12-εν-3-όνη, νταβαλλένιο, αδιπεδατόλη, 24-νορ-λουπαν-3-όνη, λουπ-20(29)εν-28-όλη (γιασμινόλη), ουρσ-20-εν-16-όλη, 4α-υδροξυφιλισαν-3-όνη και φερν-9(11)-εν-12β-όλη, ολεαν-18-εν-3-όνη, ολεαν-12-εν-3-όνη, φερν-9(11)-ένιο, φιλισ-3-ενιο, νεοχοπ-12-ένιο **(4)**, ισογλαυκανόνη, υδροξυχοπάνιο, χοπ-22(29)-ένιο (=διλοπτένιο), υδροξυχοπάνιο (=χοπανόλη), 6α-ακετοξυ-16β,22-διϋδροξυ-3-κετοϊσοχοπάνιο, 17,29-εποξυχοπάνιο, χοπαν-28,22-ολίδιο **(5)**, νεοχοπ-12-ένιο (=νεοχοπένιο), τρισνορχοπάνιο αντισογλαυκανόνη (=17αΗτρισνορχοπαν-21-όνη)³²².

Φλαβονοειδή και άλλα φαινολικά παράγωγα που έχουν απομονωθεί από το το είδος *Adiantum capillus-veneris* είναι η κερκετίνη, ο 3-γλυκοσίδης της κερκετίνης, η ρουτίνη, η ισοκερσιτρίνη, ο 3-*O*-(6''-μαλονυλο)-D-γαλακτοσίδης της κερκετίνης, το 3-*O*-γλυκουρονίδιο της κερκετίνης, η αστραγαλίνη, η νικοτιφλορίνη, ο 3,7-διγλυκοσίδης της καμπφερόλης, το 3-γλυκουρονίδιο της καμπφερόλης, ο θειούχος 3-*O*-ρουτινοσίδης της καμπφερόλης και η 3-θειούχος καμπφερόλη. Επίσης έχουν ανιχνευθεί η δαφνορετίνη **(6)** (μια δικουμαρίνη) και έξι υδροξυ-κινναμωμικά παράγωγα, 1-καφεοϋλογλυκόζη και θειούχοι εστέρες της 1-κουμαροϋλογλυκόζης, 1-κουμαροϋλογαλακτόζη, 6-θειούχος 1-π-κουμαροϋλογλυκόζη, 2-θειούχος 1-*p*-κουμαροϋλογλυκόζη, 3-θειούχος 1-καφεοϋλογλυκόζη και 6-θειούχος 1-καφεοϋλογαλακτόζη. Άλλα φαινολικά παράγωγα τα οποία έχουν εντοπισθεί σε είδη του γένους είναι η ρεζορκινόλη, η φλωρογλουκινόλη, η μεθυλοφλωρογλουκινόλη και η πυρακατεχόλη. Το συνολικό φορτίο φλαβονοειδών και φαινολικών του είδους που αναπτύσσεται στο Ιράν είναι 78.3 ± 4.5 και 22.3 ± 3 mg/g αντίστοιχα³²².

Άλλα συστατικά που έχουν ταυτοποιηθεί στο είδος *Adiantum capillus-veneris* είναι καρτενοειδή, η β-σιτοστερόλη, η στιγμαστερόλη, η καμπεστερόλη, η (*E*)-2-δεκανάλη, το κινικό οξύ, το σικμικό οξύ και μια σαπωνίνη, η οποία αποδίδει μετά από υδρόλυση υδροξυχοπανονεαγλυκόνη, γαλακτόζη, ξυλόζη και ραμνόζη. Από το αιθανολικό εκχύλισμα των φύλλων του φυτού έχουν απομονωθεί παράγωγα του νοναδεκανίου όπως 3,7,11,15-τετραμεθυλο-2-εξαδεκεν-1-όλη, εξαδεκανοϊκό οξύ, 3,7,11,15-τετραμεθυλο-εξαδεκυλεστέρας κ.ά.



Εικόνα 148. Δευτερογενείς μεταβολίτες που έχουν απομονωθεί από το *Adiantum capillus-veneris*

13.2.5 Δρογοφαρμακολογία

Εθνοφαρμακολογικές-Παραδοσιακές Χρήσεις Χρήσεις

Παραδοσιακά χρησιμοποιείται ως αντιβηχικό, αντιπυρετικό, τονωτικό, καταπραϊντικό, καθαριστικό, ψυκτικό, εφιδρωτικό, αντιμικροβιακό, αντιφλεγμονώδες, αναλγητικό, αντιβηχικό και καταπραϊντικό. Το έγχυμά του είναι ωφέλιμο στη βρογχίτιδα, στο κρυολόγημα και στη φαρυγγίτιδα. Ακόμη, δρα ως μαλακτικό για τις παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος. Βοηθά στην ψαμμίαση, στο ξηρό βήχα, στην καταρροή, στην περιφερική κυκλοφορία του αίματος και στον εγκέφαλο. Τόσο τα φύλλα όσο και τα ριζώματα του *A. capillus-veneris* L. έχουν χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή φυτοθεραπευτικών για την αντιμετώπιση του διαβήτη σε Ινδία και Ευρώπη³²³. Έχει καρδιοτονωτικές ιδιότητες και επιδρά θετικά σε κυκλοφορικά προβλήματα των άκρων, του εγκεφάλου και σε αρρυθμίες. Χρησιμοποιείται ως αποτοξινωτικό σε προβλήματα αλκοολισμού. Θεωρείται ότι επιδρά θεραπευτικά στην υπερπλασία του προστάτη, ως ανθελμινθικό και αιμοστατικό. Στη Νότια Αμερική (μέρη που βρέχονται από τον Αμαζόνιο) η χρήση του φυτού είναι γνωστή εδώ και πολλά χρόνια. Οι Περουβιανοί παρασκεύαζαν τα φύλλα του φυτού ως σιρόπι ή έγχυμα και το χρησιμοποιούσαν ως αντιβηχικό ή διουρητικό, ως εφιδρωτικό, για την αποκατάσταση της εμμηνόρροιας, για να καταπολεμήσουν παθήσεις της ουροδόχου κύστης, χολόλιθους, δυσπεψία κ.ά. Σε περιοχές της Βραζιλίας οι ιθαγενείς το χρησιμοποιούν για την αντιμετώπιση της αλωπεκίας, του βήχα, της βρογχίτιδας, της ξηρότητας λαιμού, τη βελτίωση της όρεξης και της πέψης, ως ενισχυτικό της νεφρικής λειτουργίας, ρυθμιστικό της εμμηνόρροιας και για τη διευκόλυνση τοκετού. Στο Κουρδιστάν και στο Ιράκ το αφέψημα των φύλλων και των βλαστών χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση του άσθματος, του βήχα, της διάρροιας, των λίθων των νεφρών, των κονδυλωμάτων και των παθήσεων του ουροθηλίου. Σε φυλές της Ινδίας χρησιμοποιείται ολόκληρο το φυτό για την υπογλυκαιμική και αντικαρκινική του δράση, για το κρυολόγημα, τη βρογχίτιδα και τη ρύθμιση της έμμηνου ρύσης. Εξωτερικά εφαρμόζεται για την καταπολέμηση των δοθιήνων, του εκζέματος και των πληγών. Στο Νεπάλ παρασκευάζεται μια κόλλα από τα φύλλα του φυτού η οποία εφαρμόζεται στο μέτωπο για την καταπολέμηση των πονοκεφάλων και στο στήθος για τα αναπνευστικά προβλήματα. Στη Γαλλία τα φύλλα και το ρίζωμα τα χρησιμοποιούσαν για την παρασκευή σιροπιού το οποίο αποκαλούσαν 'Sirop de Capillaire' και ήταν δημοφιλές για προβλήματα του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος, όπως βήχα ή υπερέκκριση βλέννας. Η ευρέως γνωστή ονομασία πολυτρίχι οφείλεται στο ότι κάποιοι θεραπευτές της λαϊκής ιατρικής

πίστευαν ότι προκαλεί τριχοφυΐα. Έχει αναφερθεί η τοπική εφαρμογή καταπλάσματος της δρόγης σε περιπτώσεις δηγμάτων όφρων και νυγμών μελισσών. Η δρόγη έχει αποδειχθεί αποτελεσματική σε γυναικολογικά προβλήματα και χρησιμοποιείται παραδοσιακά για τη ρύθμιση της έμμηνου ρύσης, της δυσμηνόρροιας, την υποβοήθηση της γέννας, στις ωδίνες του τοκετού. Φαίνεται ότι το φυτό είναι αποτελεσματικό στις νεαρές γυναίκες και σε όσες έχουν προβλήματα επαναφοράς του φυσιολογικού κύκλου μετά τον τοκετό ή κατά τη διακοπή των χαπιών που λαμβάνονται μετά τη γέννα. Στην Κρήτη χρησιμοποιούσαν το φυτό που συναντούσαν στα πηγάδια ή στους τοίχους των υγρών σπηλαίων για προβλήματα δυσμηνόρροιας. Γενικότερα οι θεραπευτικές του ιδιότητες εντοπίζονται κυρίως στα φύλλα. Το εξωτερικό των φύλλων του χρησιμοποιείται σε σκευάσματα κατά της πιτυρίδας ή ως τονωτικό των μαλλιών³²⁴.

Σύγχρονες φαρμακολογικές μελέτες

Τα φυτικά εκχυλίσματα του είδους όσο και οι απομονωμένοι δευτερογενείς μεταβολίτες έχουν επιδείξει αντικές, αντιμικροβιακές, διουρητικές, υπογλυκαιμικές, αντιοξειδωτικές, αντιβακτηριακές, αντιφλεγμονώδεις, αντι-ουρολιθιασικές, ανασταλτικές επί του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της δερματίτιδας, νευροπροστατευτικές, αντι-χοληστερολαιμικές και αναλγητικές δράσεις. Τα πολικά (υδατικό και μεθανολικό) εκχυλίσματα των φύλλων του *Adiantum capillus-veneris* παρουσιάζουν σημαντική ικανότητα εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών σε *in vitro* δοκιμασίες που έχουν πραγματοποιηθεί με χρήση π.χ. DPPH, ABTS κτλ^{320 325}. Αντιοξειδωτική δράση έχει επιδείξει το αιθέριο έλαιο των υπέργειων τμημάτων του φυτού, η οποία πιθανόν οφείλεται στα συστατικά καρβόνη, καρβακρόλη και θυμόλη³²¹.

Επίσης έχουν παρατηρηθεί *αντιαμμορραγικές ιδιότητες*, οι οποίες πιθανά οφείλονται στα φαινολικά παράγωγα που εντοπίζονται στα εκχυλίσματα του είδους. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε για να αξιολογηθεί *in vitro* η πιθανή αγγειογενετική δράση του αδιάντου, το μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων κλασματώθηκε σε 4 μέρη, με εξάνιο, οξικό αιθυλεστέρα, βουτανόλη και νερό. Το υδατικό κλάσμα προκάλεσε αξιοσημείωτη επαγωγή της αγγειογένεσης τόσο μέσω σχηματισμού σωληνίσκων τριχοειδών αγγείων όσο και μέσω πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων *in vitro*. Επιπλέον, στις δοκιμασίες ελέγχου της προστασίας εναντίον της καταστροφής των ινοβλαστών από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, τα υδατικά και βουτανολικά κλάσματα έδειξαν σημαντική προστατευτική δράση σε συγκεντρώσεις

50 και 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Στον έλεγχο τοξικότητας, παρατηρήθηκε ελάχιστος ερεθισμός επί της χοριοαλλαντοϊκής μεμβράνης (CAM) στη βιοδοκιμασία με τη χρήση αυγού όρνηθας, ενώ την ίδια στιγμή δεν παρατηρήθηκε σημαντική κυτταροτοξικότητα στην MTT δοκιμασία σε φυσιολογικούς ανθρώπινους ινοβλάστες δέρματος. Οι αγγειογενετικές δράσεις και οι προστατευτικές ιδιότητες εναντίον των ελεύθερων ριζών οξυγόνου, τις οποίες επέδειξε το υδατικό κλάσμα του μεθανολικού εκχυλίσματος του *A. capillus-veneris*, δικαιολογούν σε μεγάλο βαθμό την τοπική εφαρμογή του συγκεκριμένου φυτικού είδους για την πρόληψη των τραυμάτων που προκαλούνται από ακτινοβόληση και την επούλωση εξωτερικών πληγών όπως είναι τα έλκη κατάκλισης και τα εγκαύματα. Φυτοχημικά οι δράσεις αυτές υποστηρίζονται από την παρουσία флаβονοειδών στα πολικά εκχυλίσματα του φυτικού είδους, όπως είναι η κερκετίνη, αλλά και οι γλυκοσίδες της καιμπφερόλης όπως η 3-θειούχος καιμπφερόλη, ο 3-ραμνογλυκοσίδης της καιμπφερόλης και η νικοτιφλορίνη. Η κερκετίνη συγκεκριμένα, έχει αποδείξει την επιδερμική επουλωτική της δράση μέσω *in vivo* αύξησης του πολλαπλασιασμού των επιδερμικών κυττάρων σε επίμυες. Επίσης οι γλυκοσίδες σαπωνινών που φέρουν δομή τριτερπενοειδούς υδροξυχοπανόνης θα μπορούσαν να θεωρηθούν υπεύθυνα δραστικά συστατικά για την επουλωτική δράση καθώς τέτοιου είδους παράγωγα όπως οι σαπωνίνες του ασιατικοσίδη από το φυτό *Centella asiatica* και οι σαπωνίνες (damaran type saponins) από τη ρίζα του *Panax ginseng* έχουν επιδείξει αγγειογενετικές ιδιότητες. Τέλος флаβονοειδή όπως είναι τα παράγωγα κερκετίνης και καιμπφερόλης φέρουν ως γνωστόν αντιοξειδωτικές ιδιότητες και δρουν προστατευτικά ως προς την καταστροφή των κυττάρων από ελεύθερες ρίζες³²⁶.

Το 1989 επιστήμονες από το Ιράκ ανέδειξαν τις αντιμικροβιακές ιδιότητες του *A. capillus-veneris*. Μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων εμφάνισε αντιμικροβιακή δράση έναντι στελεχών *Bacillus*, *E.coli*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella typhi* και *Candida*. Το υδατικό, το μεθανολικό και το αιθανολικό εκχύλισμα των φύλλων, των βλαστών και των ριζών του αδιάντου έχουν επιδείξει αξιοσημείωτη αντιβακτηριακή και αντιμυκητιασική δράση εναντίον MDR (Multiple Drug Resistance) βακτηριακών στελεχών και στελεχών μυκήτων. Τα συγκεκριμένα εκχυλίσματα παρουσίασαν τις μεγαλύτερες ζώνες αναστολής εναντίον των εξετασθέντων στελεχών μυκήτων ενώ το εξανικό εκχύλισμα των φύλλων, βλαστών και ριζών δεν ήταν δραστικό. Το μεθανολικό εκχύλισμα των φύλλων εμφάνισε την ισχυρότερη δράση εναντίον των ειδών *Candida albicans*, *Aspergillus flavis*, *Aspergillus niger*, *Pythium* και *Trichoderma*. Το

αιθανολικό (100%) εκχύλισμα του ριζώματος του φυτού έδειξε *in vitro* αντιική δράση εναντίον του ιού που προκαλεί στοματίτιδες³²⁴.

Η ήπια αναλγητική-αντιφλεγμονώδης δράση του, η οποία βρίσκει εφαρμογή στην ανακούφιση κυρίως των πόνων γέννας στην παραδοσιακή θεραπευτική λαών, οφείλεται στις περιεχόμενες στερόλες όπως β-σιτοστερόλη, στιγμαστερόλη, καμπεστερόλη. Σε *in vivo* μελέτη που πραγματοποιήθηκε προκειμένου να ελεγχθεί η αντιφλεγμονώδης και η υπογλυκαιμική δράση του φυτικού είδους εξήχθησαν τα εξής συμπεράσματα: i) στη δοκιμασία αναστολής της φλεγμονής που επάγεται από τη φορμαλίνη (formalin induced inflammation) τόσο το ολικό αλκοολικό εκχύλισμα όσο και το κλάσμα εξανίου εμφάνισαν σημαντική ικανότητα παρεμπόδισης ενός ή περισσότερων χημικών διαμεσολαβητών. Το εκχύλισμα περιέχει флаβονοειδή τα οποία έχουν επιδείξει αντιφλεγμονώδεις δράσεις, ενώ στην περίπτωση του εξανικού κλάσματος η δράση πιθανόν οφείλεται στις στερόλες και στα τριτερπένια, ii) στη δοκιμασία αναστολής της φλεγμονής που επάγεται από κροτονέλαιο (croton oil induced inflammation) το εξανικό κλάσμα και οι ουσίες 3α-μεθοξυ-4-υδροξυφιλισάνιο και 3-β,4-α-διϋδροξυ φιλισάνιο εμφάνισαν τοπική αντιφλεγμονώδη δράση μετά από 6 ώρες, η οποία διατηρήθηκε για 30 ώρες. Η καθυστερημένη απόκριση πιθανά οφείλεται στη φτωχή απορρόφηση αυτών των μορίων κατά την τοπική εφαρμογή τους και στην ακαταλληλότητα της φόρμουλας ή/και στο γεγονός ότι οι ουσίες έχουν ήπια επίδραση για να ασκήσουν ξεκάθαρη δράση. iii) Το ολικό αλκοολικό εκχύλισμα δεν προκάλεσε υπεργλυκαιμία σε φυσιολογικούς μύες. Η μη αξιοσημείωτη υπεργλυκαιμική δράση και η μη αξιοσημείωτη υπογλυκαιμική δράση μετά το πέρας 1.5 ώρας πιθανόν οφείλονται είτε στην παρουσία σακχάρων ή υπεργλυκαιμικών παραγόντων είτε στο γεγονός ότι η δόση είναι μικρή για να εκδηλωθούν τέτοια φαινόμενα. Σημαντική υπογλυκαιμική δράση παρουσιάστηκε μετά από 30 λεπτά και συνεχίστηκε για 4 ώρες μετά τη χορήγηση σε κουνέλια που είχαν υψηλά επίπεδα γλυκόζης με πιθανά μη ινσουλινοεξαρτώμενο μηχανισμό δράσης. Όταν το αλκοολικό εκχύλισμα δόθηκε 30 λεπτά προτού γίνει η φόρτιση της γλυκόζης στα κουνέλια, μια σημαντική μείωση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα παρατηρήθηκε 30 λεπτά από τη χορήγηση της γλυκόζης πιθανά μέσω ενίσχυσης της έκκρισης ινσουλίνης από τα β κύτταρα του παγκρέατος. Οι υπογλυκαιμικές δράσεις του αλκοολικού εκχυλίσματος πιθανόν οφείλονται στα флаβονοειδή των οποίων οι υπογλυκαιμικές και αντιοξειδωτικές δράσεις είναι γνωστές³²⁷.

Η ουσία αστραγαλίνη η οποία απομονώνεται από το *Adiantum capillus-veneris* L. εμφανίζει την ικανότητα αναστολής του πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων μέσω μείωσης

της υπερέκφρασης του γονιδίου της β-1-ιντεγκρίνης. Ακόμη η ευεργετική επίδραση στη *δερματίτιδα* πιθανά οφείλεται στην αστραγαλίνη η οποία έχει την ικανότητα να προλαμβάνει την εκδήλωση της ατοπικής δερματίτιδας. Η *νευροπροστατευτική δράση* του είδους πιθανά οφείλεται στο περιεχόμενο σικιμικό οξύ το οποίο δρα μέσω μείωσης του εστιακού εγκεφαλικού ισχαιμικού τραύματος που επάγεται από μέση εγκεφαλική αρτηριακή θρόμβωση. Το αδιάντο μπορεί να *μειώσει τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης*, LDL και τριγλυκεριδίων ενώ δεν προκαλεί ταυτόχρονη μείωση της HDL. Η ναριγγίνη ίσως είναι η υπεύθυνη δραστική ουσία καθώς ελαττώνει τις συγκεντρώσεις της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων όπως και τη δράση της HMG-CoA ρεδοουκτάσης. Το είδος *Adiantum capillus-veneris L.* εμφανίζει *γαστρο-προστατευτική δράση* εναντίον της γαστροοισοφαγικής παλινδρόμησης μέσω αναστολής της έκκρισης του γαστρικού οξέος, του οξειδωτικού στρες, της παραγωγής των φλεγμονωδών κυτταροκινών και της ενδοκυτταρικής μεταφοράς ασβεστίου.

Το συγκεκριμένο φυτικό είδος έχει επιδείξει *χαμηλή τοξικότητα*. Σε *in vivo* μελέτες έχει δείξει ότι προκαλεί υπογονιμότητα. Σε 2 ανεξάρτητες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν το 1980 στην Ινδία επισημάνθηκε το γεγονός της παρεμπόδισης της σύλληψης σε επίμυες.

13.3 Πειραματικό Μέρος

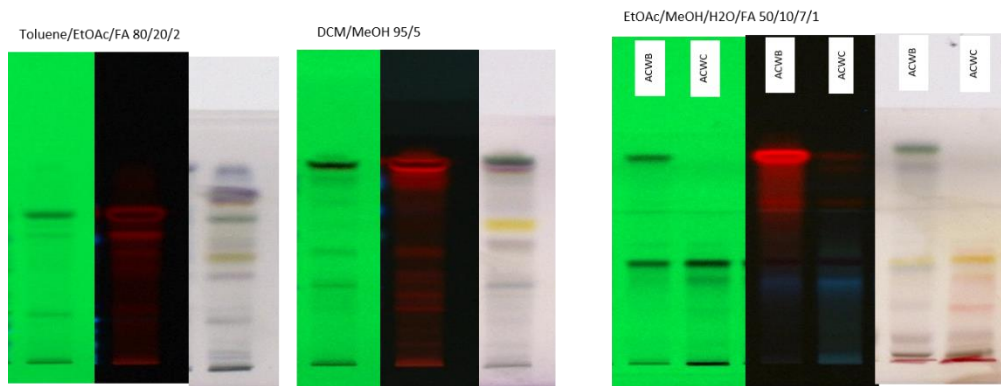
13.3.1 Εκχυλίσεις και Έλεγχος χημικού φορτίου ολικών εκχυλισμάτων

Υπέργεια τμήματα και ελάχιστες ρίζες συλλέχθηκαν στις 24.05.2015 από την Κύμη Ευβοίας, σε υψόμετρο 200m, κοντά στη περιοχή 'Plantanehof'. Ακολούθησε η ξήρανση των συλλεχθέντων υπέργειων τμημάτων σε χώρο καλά αεριζόμενο και σκοτεινό. Μετά την πλήρη απομάκρυνση της υγρασίας, το ξηρό φυτικό υλικό κονιοποιήθηκε. Η σκόνη του αδιάντου εκχυλίστηκε με τη χρήση υπερήχων χρησιμοποιώντας διαδοχικά διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας : διχλωρομεθάνιο (DCM), αιθανόλη (EtOH) και αιθανόλη:νερό 50:50 (EtOH:H₂O 50:50). Για κάθε σύστημα εκχύλισης πραγματοποιήθηκαν 2 κύκλοι, διάρκειας 30 λεπτών ο καθένας, αποφεύγοντας τη θέρμανση του υλικού (σταθερή θερμοκρασία 20-25 °C). Στην περίπτωση παρασκευής υδραλκολικών εκχυλισμάτων παρατάθηκε η διαβροχή του υλικού (δεύτερος κύκλος) για 12h προκειμένου να γίνει δυνατή η εξαντλητική παραλαβή των συστατικών. Οι διαλύτες εκχύλισης απομακρύνονταν κάθε φορά με τη χρήση Rotavapor ή

λυοφιλοποίησης όπου υπήρχε νερό και τα ξηρά εκχυλίσματα αποθηκεύτηκαν σε σκουρόχρωμα φιαλίδια. Οι αποδόσεις των εκχυλίσεων φαίνονται παρακάτω (αρχικό βάρος σκόνης: 50 g):

- διχλωρομεθανικό εκχύλισμα: 1.6029 g (απόδοση: 3.21%) (κωδικός εκχυλίσματος: ACWA)
- αιθανολικό εκχύλισμα: 1.8858 g (απόδοση: 3.77%) (κωδικός εκχυλίσματος: ACWB)
- υδραλκοολικό εκχύλισμα: 4.9703 g (απόδοση: 9.94%) (κωδικός εκχυλίσματος: ACWC)

Το χημικό φορτίο των παραληφθέντων εκχυλισμάτων ελέγχθηκε με υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας (LC-MS) (βλ. παράρτημα) και με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) όπως φαίνεται παρακάτω:

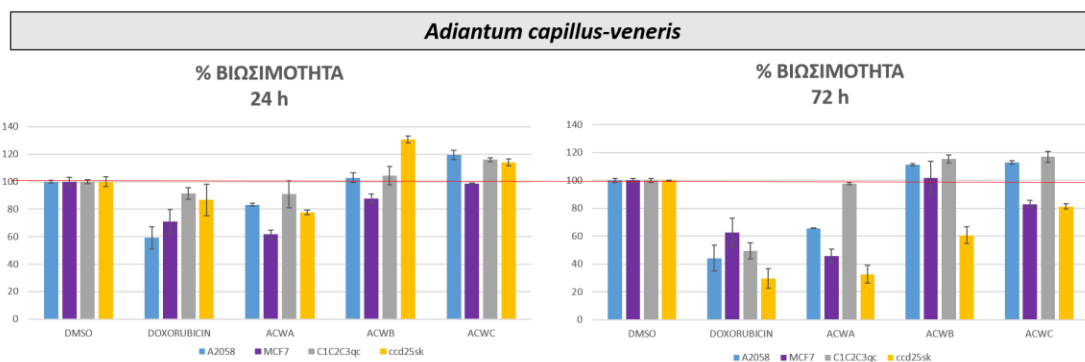


Εικόνα 149. Χρωματογραφήματα HPTLC των εκχυλισμάτων του *Adiantum capillus-veneris* σε συστήματα ανάπτυξης Toluene/EtOAc/FA 80/20/2, DCM/MeOH 95/5 για το άπολο εκχύλισμα και EtOAc/MeOH/ H₂O/FA 50/10/7/1 για τα πολικά εκχυλίσματα.

13.3.2 Βιολογική αξιολόγηση ολικών εκχυλισμάτων

Όπως έχει αναφερθεί στη γενικότερη ενότητα της βιολογικής αξιολόγησης των εκχυλισμάτων, τα πολικά εκχυλίσματα του είδους *Adiantum capillus-veneris* (Pteridaceae) έχουν επιδείξει αντιοξειδωτική ικανότητα στη δοκιμασία εξουδετέρωσης της ελεύθερης ρίζας DPPH σε συγκέντρωση 200 µg/mL (ACWB: 31.15 ± 0.25%, ACWC: 54.79 ± 0.56%) και αξιοσημείωτη αναστολή της AChE με ποσοστά 62.96 ± 2.65% (ACWB) και 88.16 ± 0.10% (ACWC) με τη μέθοδο αξιολόγησης NA-FBB, ενώ το ACWC εμφάνισε 41.18 ± 0.82% αναστολή της AChE και στη μέθοδο Ellman's.

Τα αποτελέσματα των ελέγχων κυτταροτοξικότητας παρουσιάζονται στο παρακάτω ραβδόγραμμα:



Εικόνα 150. Επίδραση των εκχυλισμάτων του *Adiantum capillus-veneris*. στη βιωσιμότητα των κυττάρων A2058, MCF7, C1C2C3qc και ccd25sk συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα, δηλαδή την ομάδα των κυττάρων που επώαστηκαν με 0,2% DMSO. Τα κύτταρα επώαστηκαν με τα εκχυλίσματα (συγκέντρωση 250 μg/mL) για 24 και 72 ώρες προτού εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. Οι αριθμοί των κυττάρων παρουσιάζονται ως % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± SEM. Ως πρότυπη ουσία χρησιμοποιήθηκε η δοξορουβικίνη.

Στις 24 ώρες επώασης των εκχυλισμάτων με τα κύτταρα, μόνο το άπολο εκχύλισμα (ACWA) εμφάνισε ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση στα MCF-7 και C1C2C3qc, σε σχέση με τη δοξορουβικίνη στη συγκέντρωση που ελέγχθηκε, χωρίς να παρατηρείται σημαντική κυτταροτοξικότητα στη φυσιολογική σειρά. Στις 72 ώρες το ίδιο εκχύλισμα εμφανίζεται ισχυρότερο από τη δοξορουβικίνη μόνο στην MCF-7 σειρά.

13.3.3 Κλασμάτωση υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος ACWC με φυγόκεντρο χρωματογραφία κατανομής (FCPC)

Το υδατοαλκοολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του είδους *Adiantum capillus-veneris* (Κωδικός εκχυλίσματος: ACWC) ήταν αυτό που μελετήθηκε για το φυτοχημικό τους περιεχόμενο και τις βιολογικές ιδιότητες του λόγω μεγαλύτερου ενδιαφέροντος.

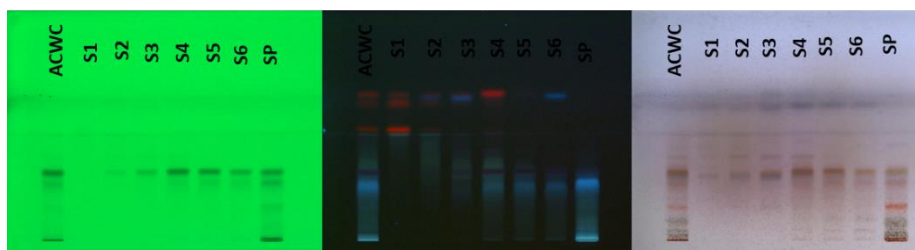
Επιλογή συστήματος:

Με βάση την πολικότητα και τη διαλυτότητα του εκχυλίσματος δοκιμάστηκε ένα σύστημα βαθμιδωτής έκλουσης βασιζόμενο στα συστήματα Oka¹⁴³, τα οποία περιέχουν 5 διαλύτες (επτάνιο (Heptane), οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc), βουτανόλη (BuOH), μεθανόλη (MeOH), νερό (H₂O)) και επιφέρουν ικανοποιητικό, γρήγορο και σε καλή αναλογία διαχωρισμό των 2 φάσεων.

Πίνακας 62. Σύστημα βαθμιδωτής έκλουσης που δοκιμάστηκε για την FCPC κλασμάτωση του εκχυλίσματος ACWC

<u>Σύστημα</u>	Heptane	EtOAc	BuOH	MeOH	H ₂ O
<u>S1</u>	2.0	4.0	0.0	1.0	5.0
<u>S2</u>	1.0	5.0	0.0	1.0	5.0
<u>S3</u>	1.0	4.5	0.5	1.0	5.0
<u>S4</u>	0.5	4.0	1.5	1.0	5.0
<u>S5</u>	0.5	3.0	2.5	1.0	5.0
<u>S6</u>	0.5	2.0	4.5	1.0	5.0

Τα αποτελέσματα του διαχωρισμού με αυτό το σύστημα φαίνονται στην παρακάτω TLC:



Εικόνα 151. TLC κατανομή συστατικών με χρήση του δοκιμαστικού συστήματος για την FCPC κλασμάτωση του εκχυλίσματος ACWC (ACWC:αρχικό εκχύλισμα), S1:κινητή φάση 1^{ου} συστήματος, S2:κινητή φάση 2^{ου} συστήματος, S3:κινητή φάση 3^{ου} συστήματος, S4:κινητή φάση 4^{ου} συστήματος, S5:κινητή φάση 5^{ου} συστήματος, SP: Στατική φάση (κάτω φάση). Σύστημα ανάπτυξης: EtOAc/MeOH/H₂O/FA 50/10/7/1

Το σύστημα επέφερε ικανοποιητικά αποτελέσματα τόσο ως προς το διαχωρισμό των δύο φάσεων όσο και ως προς το διαχωρισμό των συστατικών του εκχυλίσματος, γι αυτό και τελικά το εκχύλισμα κλασματώθηκε βαθμιδωτά με τη συγκεκριμένη αλληλουχία διφασικών συστημάτων διαλυτών όπως αναλύεται παρακάτω.

Πειραματική διαδικασία:

Ποσότητα 4.76 g του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος ACWC κλασματώθηκε με διαδικασία βαθμιδωτής έκλουσης-εξώθησης με χρήση του παραπάνω συνδυασμού συστημάτων, όπου μετά το πέρας και της έκτης κινητής φάσης, διοχετεύθηκε στατική φάση προκειμένου αυτή να παρασύρει τα πιο πολικά συστατικά του εκχυλίσματος και να ολοκληρωθεί ο διαχωρισμός τους. Οι συνθήκες του πειράματος φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 63. Συνθήκες FCPC κλασμάτωσης του εκχυλίσματος ACWC

Βάρος εκχυλίσματος	4.76 g
Διαλύτες	Heptane/EtOAc/BuOH/MeOH/H ₂ O

Στροφές	700 rpm
Ροή	6 mL/min
Κινητή φάση	πάνω φάση (οργανική)
Στατική φάση	κάτω φάση (υδατική)
Ρύθμιση	Ascending

Χρησιμοποιήθηκε στήλη 1000 mL. Η εξισορρόπηση του συστήματος πραγματοποιήθηκε στην αναλογία 740mL στατικής φάσης : 260 mL κινητής φάσης. Το εκχύλισμα διαλύθηκε σε μείγμα 50:50 στατικής (κάτω) :κινητής (πάνω) φάσης (χρησιμοποιήθηκε Ισορ 30 mL). Συλλέχθηκαν 120 κλάσματα όγκου 50 mL το καθένα, τα οποία συνενώθηκαν σε 52 με βάση το χημικό τους φορτίο, όπως φάνηκε στη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Η απόδοση του πειράματος ήταν 98.7%.

Πίνακας 64. Συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν από την FCPC κλασμάτωση του εκχυλίσματος ACWC

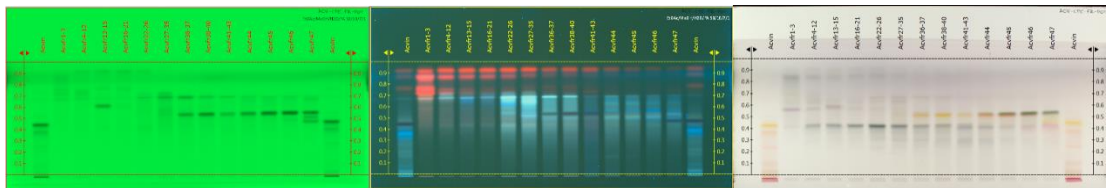
ΚΩΔΙΚΟΣ CPC ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΒΑΡΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ (mg)
A.c-v. CPC FR1-3	22.4
A.c-v. CPC FR4-12	27.4
A.c-v. CPC FR13-15	7.1
A.c-v. CPC FR16-21	12.3
A.c-v. CPC FR22-26	16.1
A.c-v. CPC FR27-35	19.2
A.c-v. CPC FR36-37	3.5
A.c-v. CPC FR38-40	4.8
A.c-v. CPC FR41-43	8.5
A.c-v. CPC FR44	5.2
A.c-v. CPC FR45	7.6
A.c-v. CPC FR46	9.5
A.c-v. CPC FR47	9.6
A.c-v. CPC FR48	12.8
A.c-v. CPC FR49	17.6
A.c-v. CPC FR50-53	51
A.c-v. CPC FR54-58	60.8
A.c-v. CPC FR59-60	56.1
A.c-v. CPC FR61-63	85.8
A.c-v. CPC FR64	25.7
A.c-v. CPC FR65	25.3
A.c-v. CPC FR66	24.1
A.c-v. CPC FR67	20.3
A.c-v. CPC FR68-69	35.2

A.c-v. CPC FR70	19.2
A.c-v. CPC FR71	19.9
A.c-v. CPC FR72	16.4
A.c-v. CPC FR73	15.3
A.c-v. CPC FR74	14.5
A.c-v. CPC FR75-77	34.2
A.c-v. CPC FR78-79	47.4
A.c-v. CPC FR80-81	33.9
A.c-v. CPC FR82-84	37.7
A.c-v. CPC FR85-86	23.6
A.c-v. CPC FR87-88	17.9
A.c-v. CPC FR89-90	15.3
A.c-v. CPC FR91-92	16.2
A.c-v. CPC FR93	8.5
A.c-v. CPC FR94	10.9
A.c-v. CPC FR95	11.6
A.c-v. CPC FR96-98	34.4
A.c-v. CPC FR99-100	22.9
A.c-v. CPC FR101-103	44.2
A.c-v. CPC FR104-106	144.7
A.c-v. CPC FR107	280.2
A.c-v. CPC FR108	351.7
A.c-v. CPC FR109	399.7
A.c-v. CPC FR110	806.8
A.c-v. CPC FR111	672.8
A.c-v. CPC FR112-114	843.7
A.c-v. CPC FR115-120	107.6
A.c-v. CPC WASTE	20.8

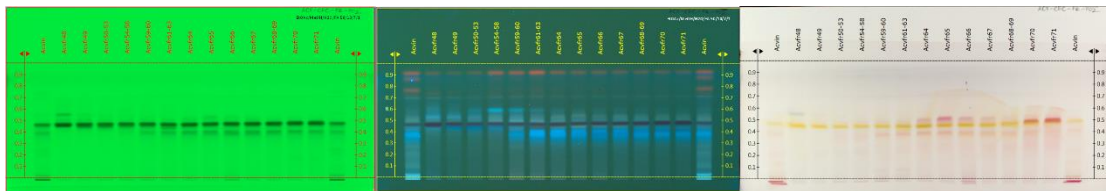
13.3.4 Έλεγχος χημικού φορτίου FCPC κλασμάτων με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC)

Για τον ποιοτικό έλεγχο των συνενωμένων FCPC κλασμάτων που προέκυψαν από το εκχύλισμα ACWC χρησιμοποιήθηκε η τεχνική HPTLC. Τα συστήματα ανάπτυξης, οι συγκεντρώσεις και οι όγκοι των κλασμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην HPTLC ανάλυση προέκυψαν μετά από δοκιμές και αναλύονται ακολούθως.

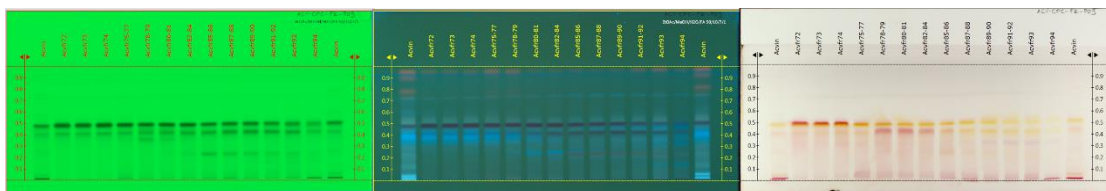
Σε κάθε πλάκα έγινε απόθεση 15 μL από κάθε διάλυμα συνενωμένου κλάσματος συγκέντρωσης 1 mg/mL στον κατάλληλο διαλύτη ή μείγμα διαλυτών. Τα συστήματα ανάπτυξης των πλακών επιλέχθηκαν με τρόπο τέτοιο ώστε να είναι δυνατή η παρατήρηση του μεγαλύτερου ποσοστού των μεταβολιτών που περιέχονται στο εκάστοτε κλάσμα. Οι ανεπτυγμένες πλάκες παρατηρήθηκαν και φωτογραφήθηκαν στα μήκη κύματος 254 και 366 nm, ενώ μετά τη σάρωση των χρωματογραφημάτων και τη λήψη των φασμάτων απορρόφησης στα μήκη κύματος 200, 254, 280 και 366 nm, πραγματοποιήθηκε η εμβάπτιση των πλακών σε διάλυμα θειικής βανιλίνης. Παρακάτω παρουσιάζονται οι πλάκες TLC των κλασμάτων.



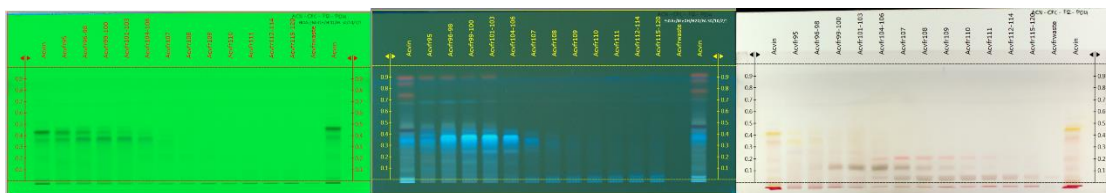
Εικόνα 152. ACWC-P01 (EtOAc:MeOH:H₂O:FA 50:10:7:1)-Κλάσματα 1-47



Εικόνα 153. ACWC-P02 (EtOAc:MeOH:H₂O:FA 50:10:7:1)-Κλάσματα 48-71



Εικόνα 154. ACWC-P03 (EtOAc:MeOH:H₂O:FA 50:10:7:1)-Κλάσματα 72-94



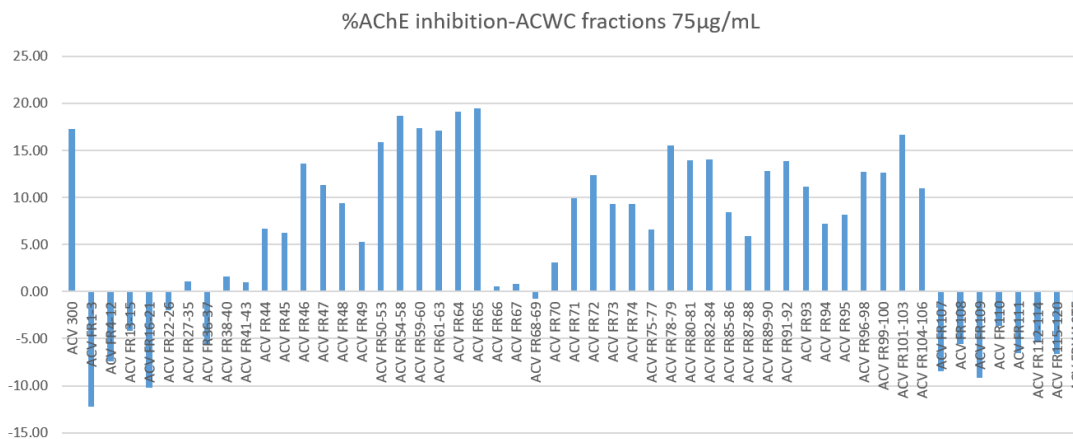
Εικόνα 155. ACWC-P04 (EtOAc:MeOH:H₂O:FA 50:10:7:1)-Κλάσματα 95-WASTE

13.3.5 Βιολογική αξιολόγηση των FCPC κλασμάτων

- *In vitro* έλεγχος ικανότητας αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης (Μέθοδος Ellman's)

Το εκχύλισμα ACWC ελέγχθηκε στα 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και τα κλάσματα που προέκυψαν από αυτό

στα 75 µg/mL ως προς την ικανότητα αναστολής της AChE. Ως πρότυπος αναστολέας χρησιμοποιήθηκε η ουσία γαλανταμίνη σε συγκέντρωση 1.36 µM, με την οποία προκαλείται αναστολή της AChE σε ποσοστό $40.00 \pm 1.1\%$. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα.

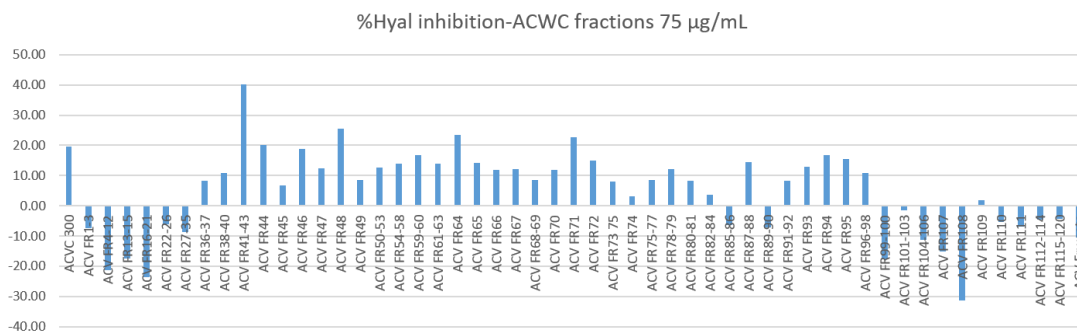


Εικόνα 156. Ραβδόγραμμα %αναστολής της AChE του εκχύλισματος ACWC (υδραλκολικό εκχύλισμα *Adiantum capillus-veneris*) σε συγκέντρωση 300 µg/mL και των FCPC κλασμάτων του σε συγκέντρωση 75 µg/mL. Η γαλανταμίνη χρησιμοποιήθηκε ως γνωστός πρότυπος αναστολέας της AChE σε συγκέντρωση 1.36 µM. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως η μέση τιμή τριών επαναλήψεων της μέτρησης του δείγματος.

Το εκχύλισμα ACWC προκαλεί 17.32% αναστολή στα 300 µg/mL. Από το κλάσμα ACV FR.1-3 έως το κλάσμα ACV FR.45 παρατηρούνται ποσοστά αναστολής μικρότερα του 10.00%. Από το κλάσμα ACV FR.46 έως το κλάσμα ACV FR.65 τα ποσοστά αναστολής είναι μεγαλύτερα του 10.00% και κυμαίνονται από 11.34% (ACV FR.47) έως 19.49% (ACV FR.65). Από το κλάσμα ACV FR.66 έως ACV FR.71 τα ποσοστά αναστολής είναι μικρότερα του 10.00%. Τέλος από το κλάσμα ACV FR.72 έως το κλάσμα ACV FR.106 τα ποσοστά που σημειώνονται είναι μεγαλύτερα του 10.00%, π.χ. ACV FR.73: 9.30% και ACV FR.78-79: 15.50%, ενώ από το κλάσμα ACV FR.107 έως το τέλος δεν εντοπίζεται κάποια αξιολογώσιμη δράση.

- *In vitro* έλεγχος ικανότητας αναστολής της υαλουρονιδάσης

Το εκχύλισμα ACWC ελέγχθηκε σε τελική συγκέντρωση 300 µg/mL και τα κλάσματα που προέκυψαν από αυτό στα 75 µg/mL ως προς την ικανότητα αναστολής της Hyal. Ως πρότυπος αναστολέας χρησιμοποιήθηκε η ουσία ροσμαρινικό οξύ σε συγκέντρωση 400 µM η οποία προκαλεί $91.79 \pm 0.6\%$ αναστολή του ενζύμου. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα.



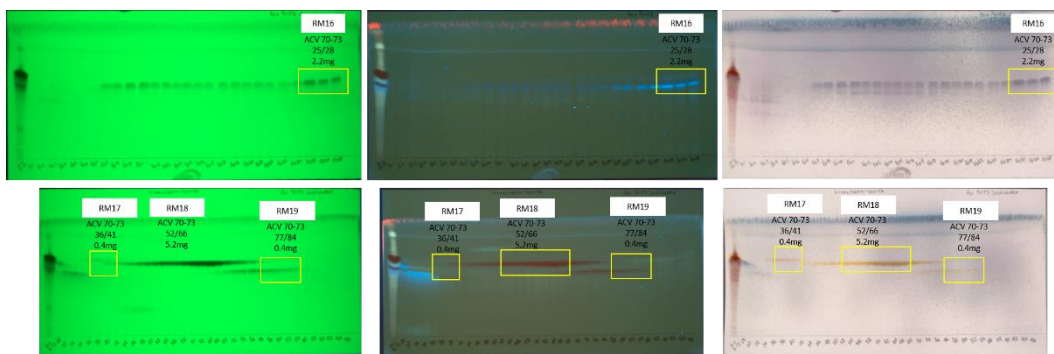
Εικόνα 157. Ραβδόγραμμα %αναστολής της Hyal του εκχυλίσματος ACWC (υδραλκολικό εκχύλισμα *Adiantum capillus-veneris*) σε συγκέντρωση 300 µg/mL και των FCPC κλάσμάτων του σε συγκέντρωση 75 µg/mL. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως η μέση τιμή τριών επαναλήψεων της μέτρησης του δείγματος.

Το αρχικό εκχύλισμα (ACWC) στα 300 µg/mL δεν παρουσιάζει αξιοσημείωτη δράση (19.64±1.23%). Κανένα από τα κλάσματα δεν επιδεικνύει σημαντική αναστολή της υαλουρονιδάσης στα 75 µg/mL. Παρατηρούνται τα εξής: από το κλάσμα ACV FR.1-3 έως το κλάσμα ACV FR.38-40 τα ποσοστά αναστολής είναι μικρότερα του 10.00%, από το κλάσμα ACV FR.41-43 έως το κλάσμα ACV FR.73 τα ποσοστά αναστολής είναι περίπου ίσα ή μεγαλύτερα του 10.00%, π.χ. ACV FR.49: 8.40%, ACV FR.41-43: 40.16%, ACV FR.48: 25.38% και από το το κλάσμα ACV FR.74 έως το τελευταίο κλάσμα οι δράσεις είναι μικρότερες του 10.00% εκτός από τα κλάσματα ACV FR.91-92: 8.20% έως ACV FR.96-98: 10.93% (ACV FR.94: 16.72%).

13.3.6 Απομόνωση και ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών

Μετά από χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού απομονώθηκαν οι εξής μεταβολίτες:

ACV FR.70-73: 51 mg του κλάσματος υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με στατική φάση sephadex LH-20 και κινητή φάση MeOH.



Εικόνα 158. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας των κλασμάτων της *serhadex* στο κλάσμα ACV FR.70-73. Σύστημα ανάπτυξης EtOAc/MeOH/H₂O/Formic acid 50/10/7/1

Παρελήφθησαν 100 κλάσματα όγκου 500 μ l το καθένα, από τα οποία 4 συνενωμένα κλάσματα ελέγχθησαν ως προς το χημικό τους φορτίο με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

Κωδικός κλάσματος	Κωδικός NMR	Βάρος δείγματος (mg)
ACV 70-73 25/28	RM16	2.2
ACV 70-73 36/41	RM17	0.4
ACV 70-73 52/66	RM18	5.2
ACV 70-73 77/84	RM19	0.4

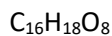
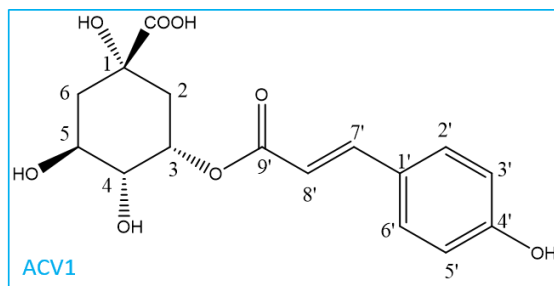
Στο κλάσμα RM16 παραλήφθηκε το 3-*O-trans*-κουμαροϋλοκινικό οξύ και σε μικρή ποσότητα το αντίστοιχο *cis*- παράγωγο (ACV1).

Στο κλάσμα RM17 παραλήφθηκε το 7-*O*-γλυκουρονίδιο της ναρινγενίνης (ACV2).

Στο κλάσμα RM18 παραλήφθηκε το 3-*O*-γλυκουρονίδιο της καιμπφερόλης (ACV3).

Στο κλάσμα RM19 παραλήφθηκε το 3-*O*-γλυκουρονίδιο της κερκετίνης (ACV4).

Ο μεταβολίτης (ACV1) ταυτοποιήθηκε ως το 3-*O-trans*-κουμαροϋλοκινικό οξύ (MW=338.314 g/mol) με τη βοήθεια πειράματος ¹H-NMR και επιβεβαίωση από τη βιβλιογραφία³²⁸.



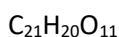
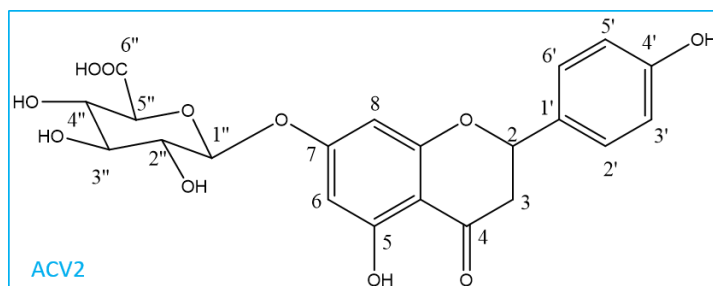
Πίνακας 65. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 3-O-trans-κουμαροϋλοκινικού οξέος (MeOD, 200 MHz)

Πρωτόνιο	$^1\text{H-NMR}$ [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]
1	-
2	2.13 (2H, brs)
3	5.36 (1H, brs)
4	3.74 (1H, d, $J = 6.1$ Hz)
5	4.19 (1H, brs)
6	2.13 (2H, brs)
1'	-
2'	7.48 (1H, d, $J = 8.1$ Hz)
3'	6.82 (1H, d, $J = 8.1$ Hz)
4'	-
5'	6.82 (1H, d, $J = 8.1$ Hz)
6'	7.48 (1H, d, $J = 8.1$ Hz)
7'	7.64 (1H, d, $J = 15.4$ Hz)
8'	6.35 (1H, d, $J = 15.4$ Hz)
9'	-

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας, και συγκεκριμένα στην αρωματική περιοχή, παρατηρούνται ένα *para*- σύστημα στα 7.48 ppm και 6.82 ppm και ένας *trans*- διπλός δεσμός στα 7.64 ppm και 6.35 ppm (ο αντίστοιχος *cis*- διπλός δεσμος στα 6.87 ppm και 5.81 ppm). Στα 5.36 ppm υπάρχει η κορυφή του H-3, του πιο αποθωρακισμένου πρωτονίου του κινικού οξέος, που συνδέεται με τον κουμαροϋλο- υποκαταστάτη ενώ στην 2.13-4.19 ppm υπάρχουν οι κορυφές των υπόλοιπων πρωτονίων.

Το 3-*O-trans*-κουμαροϋλοκινικό οξύ (ACV1) αποτελεί κοινό φυτικό μεταβολίτη. Παράγωγα κινικού οξέος έχουν ανιχνευθεί στο *Adiantum capillus-veneris*³²⁹. Ακόμη έχει παραληφθεί από τα άνθη του *Calendula officinalis* (Asteraceae)³³⁰, τους καρπούς του *Cydonia vulgaris* (Rosaceae), τους καρπούς του *Prunus cerasus* (Rosaceae)³³¹, τα υπέργεια τμήματα του *Pulmonaria officinalis* (Boraginaceae)³³², από το *Humulus lupulus* (Cannabaceae)³³³, τα υπέργεια τμήματα του *Lactuca indica* (Compositae), τα φύλλα του *Lonicera henryi* (Caprifoliaceae)³³⁴ κ.ά. Έχει επιδείξει αντιοξειδωτική δράση με τις μεθόδους DPPH, σουπεροξειδικού ανιόντος και νιτρικού οξειδίου και αντιπολλαπλασιαστική δράση στη σειρά B16-F1. Ακόμη έχει εμφανίσει ηπατοπροστατευτική και αντική δράση έναντι του ιού της ηπατίτιδας Β (HBV)³³⁵ και αντιδιαβητική δράση³³⁶.

Ο μεταβολίτης (ACV2) ταυτοποιήθηκε ως το 7-*O*-γλυκουρονίδιο της ναρινγενίνης (naringenin 7-*O*-glucuronide) (MW=448.383 g/mol) με τη βοήθεια NMR πειραμάτων 1D (¹H-NMR) και 2D (COSY, HSQC-DEPT, HMBC) και επιβεβαίωση από τη βιβλιογραφία³³⁷.



Πίνακας 66. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 7-*O*-γλυκουρονιδίου της ναρινγενίνης (MeOD, 600 MHz)

Θέση	¹ H-NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]	¹³ C (ppm)
2	5.41 (1H, dd, J = 13.3/2.6 Hz)	80.26
3	(α) 3.19 (1H, dd, J = 17.4/13.3 Hz) (β) 2.77 (1H, dd, J = 17.4/2.6 Hz)	43.58
4	-	163.61
5	-	158.02
6	6.21 (1H, d, J = 2.2 Hz)	97.35
7	-	160.0

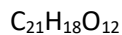
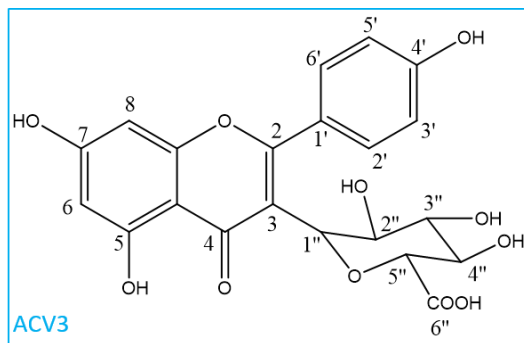
8	6.25 (1H, d, $J = 2.2$ Hz)	97.00
1'	-	129.12
2'	7.35 (2H, d, $J = 8.7$ Hz)	129.01
3'	6.84 (2H, d, $J = 8.7$ Hz)	116.20
4'	-	157.39
5'	6.84 (2H, d, $J = 8.7$ Hz)	116.20
6'	7.35 (2H, d, $J = 8.7$ Hz)	129.01
1''	5.10 (1H, d, $J = 7.1$ Hz)	100.69
2''	3.49 (1H, m)	73.29
3''	3.51 (1H, m)	77.39
4''	3.69 (1H, m)	73.63
5''	3.84 (1H, d, $J = 8.6$ Hz)	76.45
6''	-	n.d.

n.d. δεν προσδιορίστηκε

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας παρατηρούνται οι κορυφές των πρωτονίων ενός παρα-συστήματος στα 7.35 ppm και 6.84 ppm, οι κορυφές των πρωτονίων των θέσεων 2 και 3 μιας φλαβονόνης καθώς και οι αποθωρακισμένες κορυφές των πρωτονίων των θέσεων 6 και 8 φλαβονόνης που φέρει σάκχαρο στη θέση 7 στα 6.21 ppm και 6.25 ppm αντίστοιχα. Το σάκχαρο της θέσης 7 είναι γλυκουρονίδιο καθώς απουσιάζουν οι κορυφές της 6 θέσης που παρατηρούνται στην περίπτωση της γλυκόζης.

Το 7-Ο-γλυκουρονίδιο της ναρινγενίνης δεν έχει προηγουμένως απομονωθεί από το γένος *Adiantum*. Έχει παραληφθεί από τα φύλλα του *Garcinia prainiana* (Clusiaceae)³³⁸, από είδη του γένους *Citrus* (Rutaceae), από τα υπέργεια τμήματα του *Centaurea urvillei* ssp. *urvillei* (Compositae). Έχει επιδείξει ποικίλες βιολογικές δράσεις όπως αντιφλεγμονώδη³³⁹, αντιαλλεργική και αντιαποπτωτική. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ικανότητα της ουσίας να δεσμεύει και να αναστέλλει την πρωτεΐνη CRMP-2 (collapsing response mediator protein) η οποία υπερφωσφορυλιώνεται στη νόσο Alzheimer³⁴⁰.

Ο μεταβολίτης (ACV3) ταυτοποιήθηκε ως το 3-Ο-γλυκουρονίδιο της καιμπφερόλης (kaempferol 3-O-glucuronide) (MW=462.363 g/mol) με τη βοήθεια ¹H-NMR πειράματος και επιβεβαίωση από τη βιβλιογραφία³⁴¹.



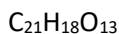
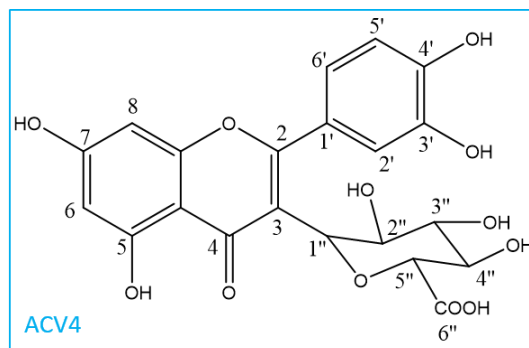
Πίνακας 67. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 3-Ο-γλυκουρονιδίου της καιμπφερόλης (MeOD, 200 MHz)

Θέση	¹ H-NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]
2	-
3	-
4	-
5	-
6	6.20 (1H, d, J = 1.9 Hz)
7	-
8	6.40 (1H, d, J = 1.9 Hz)
1'	-
2'	8.05 (2H, d, J = 8.7 Hz)
3'	6.86 (2H, d, J = 8.7 Hz)
4'	-
5'	6.86 (2H, d, J = 8.7 Hz)
6'	8.05 (2H, d, J = 8.7 Hz)
1''	5.32 (1H, d, J = 7.1 Hz)
2''	3.53-3.42 (1H, m)
3''	3.53-3.42 (1H, m)
4''	3.56 (1H, t, J = 8.9 Hz)

5''	3.72 (1H, d, J = 9.8 Hz)
-----	--------------------------

Η ουσία ACV3 έχει απομονωθεί ξανά από το είδος *Adiantum capillus-veneris*^{342 343}. Άλλες πηγές απομόνωσης του μεταβολίτη είναι τα είδη *Phaseolus vulgaris* (Leguminosae), *Polygonum aviculare* (Polygonaceae), φύλλα του *Euphorbia sororia* (Euphorbiaceae), φύλλα του *Centella erecta* και *C. asiatica* (Apiaceae), φύλλα του *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae), υπέργεια τμήματα *Sanguisorba minor* (Rosaceae). Έχει παραληφθεί από το είδος *Alpinia zerumbet* (Zingiberaceae) και έχει επιδείξει αντικαρκινική δράση έναντι των A549 κυττάρων καρκίνου πνεύμονα και δράση κατά της απώλειας των μαλλιών μέσω αύξησης του πολλαπλασιασμού των ανθρώπινων επιδερμικών κυττάρων του τριχωτού της κεφαλής³⁴¹. Απομονώθηκε από τα υπέργεια τμήματα του είδους *Hypericum laricifolium* Juss. (Hypericaceae) και αξιολογήθηκε ως προς την ικανότητα αναστολής της τυροσινάσης χωρίς να εμφανίσει αξιοσημείωτα αποτελέσματα³⁴⁴. Παραλήφθηκε από εκχύλισμα φύλλων του κινεζικού είδους *Cyclocarya paliurus* (Juglandaceae) και επέδειξε αντιοξειδωτική και σημαντική ηπατοπροστατευτική δράση έναντι της οξείας βλάβης του ήπατος που προκαλείται από τετραχλωράνθρακα σε μύες³⁴⁵. Τέλος έχει αξιολογηθεί *in vivo* ως προς την αντιφλεγμονώδη δράση του χωρίς να εμφανίσει σημαντική αναστολή³⁴⁶.

Ο μεταβολίτης (ACV4) ταυτοποιήθηκε ως το 3-Ο-γλυκουρονίδιο της κερκετίνης (quercetin 3-O-glucuronide, querciturone, miquelianin) (MW=478.36 g/mol) με τη βοήθεια ¹H-NMR πειράματος και επιβεβαίωση από τη βιβλιογραφία³⁴⁷.



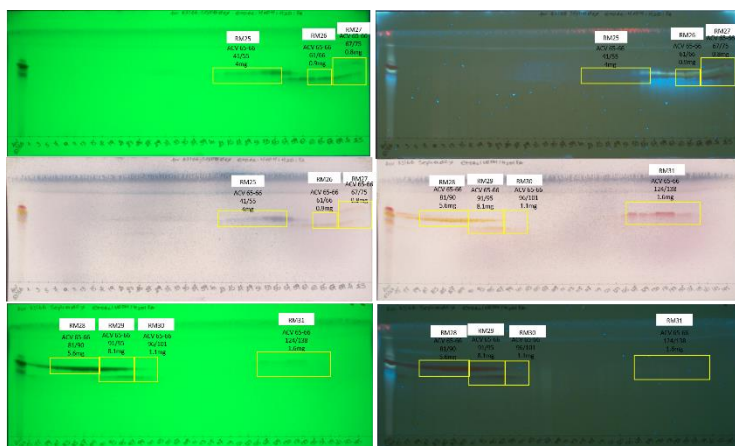
Πίνακας 68. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 3-Ο-γλυκουρονιδίου της κερκετίνης (MeOD, 400 MHz)

Θέση	¹ H-NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, <i>J</i> (Hz))]
2	-
3	-
4	-
5	-
6	6.20 (1H, d, <i>J</i> = 2.1 Hz)
7	-
8	6.39 (1H, d, <i>J</i> = 2.1 Hz)
1'	-
2'	7.66 (1H, d, <i>J</i> = 2.1 Hz)
3'	-
4'	-
5'	6.84 (1H, d, <i>J</i> = 8.2 Hz)
6'	7.62 (1H, dd, <i>J</i> = 8.2/2.1 Hz)
1''	5.33 (1H, d, <i>J</i> = 7.9 Hz)
2''	3.43-3.59 (1H, m)
3''	3.43-3.59 (1H, m)
4''	3.56 (1H, t, <i>J</i> = 8.8 Hz)
5''	3.72 (1H, d, <i>J</i> = 9.4 Hz)

Η ουσία ACV4 έχει απομονωθεί ξανά από το είδος *Adiantum capillus-veneris*³⁴⁸. Έχει ακόμη παραληφθεί από πολλά φυτικά είδη όπως τα φύλλα, τους βλαστούς και τα άνθη του *Hypericum laricifolium* (Hypericaceae), το *Phaseolus vulgaris* (Leguminosae), τα υπέργεια τμήματα του *Alchemilla barbatiflora* (Rosaceae), τα υπέργεια τμήματα του *Tamarix gallica* (Tamaricaceae), τα υπέργεια τμήματα του *Potentilla parvifolia* (Rosaceae)³⁴⁹, τους καρπούς, τα άνθη και τα φύλλα του *Foeniculum vulgare* (Apiaceae), τα υπέργεια τμήματα του *Sanguisorba minor* (Rosaceae) κ.ά. Το 3-Ο-γλυκουρονίδιο της κερκετίνης έχει εμφανίσει ποικίλες φαρμακολογικές δράσεις *in vitro* όπως μέτρια αντιοξειδωτική³⁵⁰, αντιφλεγμονώδη, κυτταροπροστατευτική, αντιαλλεργική, αναστολή της α -γλυκοσιδάσης³⁵¹, μέτρια αντιπαρασιτική³⁵² και αντικαρκινική σε σειρές όπως η A549 καρκίνου πνεύμονα³⁵³. Σε μελέτη συμπεριφοράς *in vivo* παρουσίασε σημαντική αντικαταθλιπτική δράση σε επίμυες με το τεστ

forced swimming, σε αντίθεση με το άγλυκο³⁵⁴.

ACV FR.65-66: 40 mg του κλάσματος υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με στατική φάση sephadex LH-20 και κινητή φάση MeOH.



Εικόνα 159. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας των κλασμάτων της sephadex στο κλάσμα ACV FR.65-66. Σύστημα ανάπτυξης EtOAc/MeOH/H₂O/Formic acid 50/10/7/1

Παρελήφθησαν 145 κλάσματα όγκου 500 μL το καθένα, από τα οποία 7 συνενωμένα κλάσματα ελέγχθησαν ως προς το χημικό τους φορτίο με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

Κωδικός κλάσματος	Κωδικός NMR	Βάρος δείγματος (mg)
ACV 65-66 41/55	RM25	4.0
ACV 65-66 61/66	RM26	0.9
ACV 65-66 67/75	RM27	0.8
ACV 65-66 81/90	RM28	5.6
ACV 65-66 91/95	RM29	8.1
ACV 65-66 96/101	RM30	1.1
ACV 65-66 124/138	RM31	1.6

Στο κλάσμα RM25 παραλήφθηκε μείγμα (αναλογίας, περίπου, 1:1) των *cis* και *trans*-3-*O*-πικουμαροϋλοκινικών οξέων (ACV1).

Στο κλάσμα RM26 παραλήφθηκε το νεοχλωρογενικό οξύ (*trans*-3-*O*-*p*-καφεοϋλοκινικό οξύ) (ACV5).

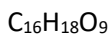
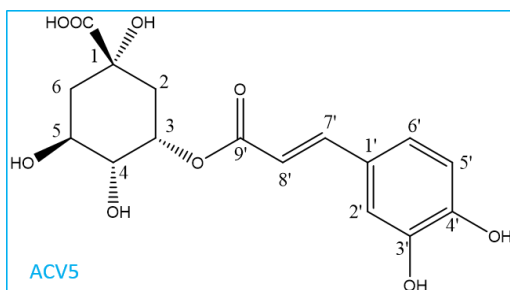
Στο κλάσμα RM27 παραλήφθηκε μείγμα 3-*O*-γλυκουρονιδίου της καιμπφερόλης (ACV3), παραγώγου χλωρογενικού οξέος και ναριρουτίνης (ACV6), ως κύριο συστατικό.

Στα κλάσματα RM28 και RM29 παραλήφθηκε το 3-*O*-γλυκουρονίδιο της καιμπφερόλης (ACV3).

Στο κλάσμα RM30 παραλήφθηκε μείγμα του 3-*O*-γλυκουρονιδίου της καιμπφερόλης (ACV3), του 3-*O*-γλυκουρονιδίου της κερκετίνης (ACV4) και μιας γλυκοζυλιωμένης φλαβανόνης (H-8: 6.00 ppm, H-6: 5.90 ppm, H-2'/H-6': 7.20 ppm, H-3'/H-5': 6.85 ppm).

Το κλάσμα RM31 δεν ταυτοποιήθηκε, αν και πιθανόν πρόκειται για μίγμα υδρολυόμενων ταννινών.

Ο μεταβολίτης (ACV5) ταυτοποιήθηκε ως το νεοχλωρογενικό οξύ (MW= 354.314 g/mol) με τη βοήθεια ¹H-NMR πειράματος και επιβεβαίωση από τη βιβλιογραφία³⁵⁵.



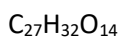
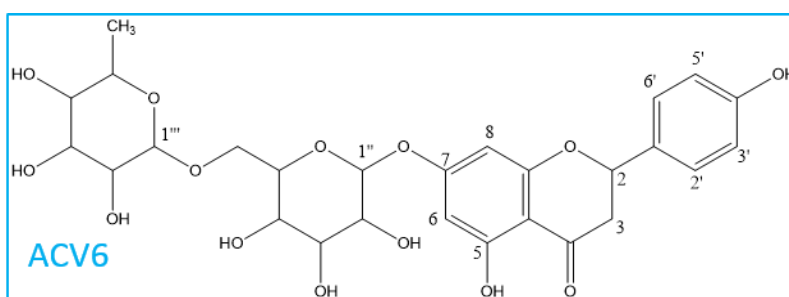
Πίνακας 69. Φασματοσκοπικά δεδομένα του νεοχλωρογενικού οξέος (MeOD, 200 MHz)

Θέση	¹ H-NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]
1	-
2	2.07-2.24 (2H, m)
3	4.17 (1H, brs)
4	3.73 (1H, dd, J = 9.1/2.8 Hz)
5	5.37 (1H, brs)
6	2.07-2.24 (2H, m)
1'	-
2'	7.07 (1H, d, J = 1.6 Hz)

3'	-
4'	-
5'	6.79 (1H, d, $J = 8.1$ Hz)
6'	6.97 (1H, d, $J = 8.1/1.6$ Hz)
7'	7.58 (1H, d, $J = 15.9$ Hz)
8'	6.29 (1H, d, $J = 15.9$ Hz)

Παράγωγα κινικού οξέος έχουν ανιχνευθεί στο *Adiantum capillus-veneris*³²⁹. Το νεοχλωρογενικό οξύ έχει απομονωθεί από ποικίλους φυτικούς οργανισμούς όπως τα φύλλα του *Artemisia princeps* (Asteraceae), τον καρπό του *Prunus persica* (Rosaceae), *Prunus cerasus*³³¹, από το *Morus nigra* (Moraceae)³⁵⁶, τα φύλλα του *Lasertium latifolium* (Ariaceae), τα άνθη του *Lonicera japonica* (Caprifoliaceae)³⁵⁷, το *Hibiscus* spp. (Malvaceae), τους καρπούς καφέ κ.ά. Έχει δείχθει ότι ο συγκεκριμένος μεταβολίτης ασκεί αντιφλεγμονώδη³⁵⁸ μέσω αναστολής της φωσφολιπάσης A2, αντιοξειδωτική, αντι-πολλαπλασιαστική σε σειρές όπως η U937 (ανθρώπινου λεμφώματος) και η MCF-7 (ανθρώπινου καρκίνου στήθους), αντική, αντιβιοτική³⁵⁹ δράση και προκαλεί αναστολή της τυροσινάσης³¹².

Ο μεταβολίτης (ACV6) ταυτοποιήθηκε ως η ναριρουτίνη (narirutin) (MW=580.539 g/mol) με τη βοήθεια ¹H-NMR πειράματος και επιβεβαίωση από τη βιβλιογραφία³⁶⁰.



Πίνακας 70. Φασματοσκοπικά δεδομένα της ναριρουτίνης (MeOD, 200 MHz)

Θέση	¹ H-NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]	
2	5.37 (1H, dd, $J = 12.3/2.8$ Hz)	
3	(a) 3.14 (1H, dd, $J = 17.1/12.3$ Hz)	(b) 2.74 (1H, dd, $J = 17.1/2.8$ Hz)
5	-	

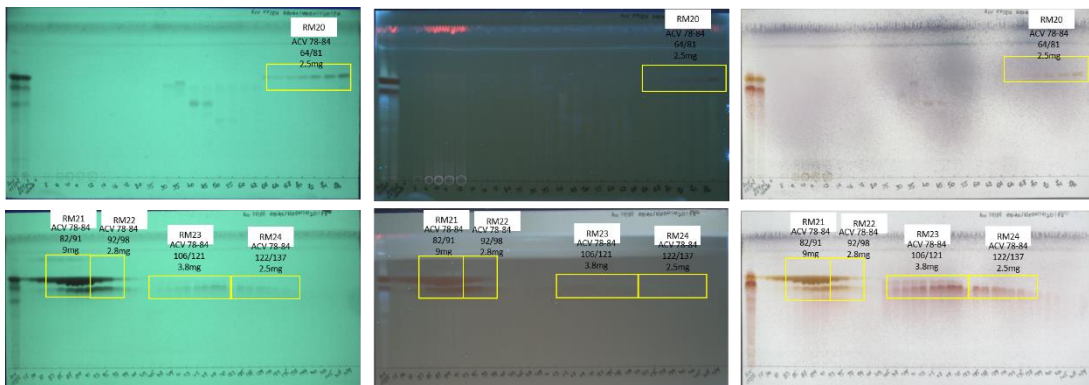
6	6.15 (1H, d, $J = 2.3$ Hz)
7	-
8	6.17 (1H, d, $J = 2.3$ Hz)
1'	-
2'	7.33 (2H, d, $J = 8.2$ Hz)
3'	6.77 (2H, d, $J = 8.2$ Hz)
4'	-
5'	6.77 (2H, d, $J = 8.2$ Hz)
6'	7.33 (2H, d, $J = 8.2$ Hz)
1''	5.02 (1H, d, $J = 7.2$ Hz)
1'''	5.36 (1H, d, $J = 1.8$ Hz)
2''-6'''	3.29-3.90
CH3-rham	1.12 (3H, d, $J = 6.1$ Hz)

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές κορυφές μιας φλαβανόνης που φέρει σάκχαρο στη θέση 7. Πιο συγκεκριμένα εμφανίζονται στα 5.37 ppm η κορυφή του H-2, στα 3.14 και 2.74 ppm οι 2 κορυφές των πρωτονίων της θέσης 3, στα 6.17 και 6.15 ppm οι αποθωρακισμένες κορυφές των θέσεων 8 και 6 ενώ στα 7.33 και 6.77 ppm υπάρχουν οι κορυφές των αρωματικών πρωτονίων. Τέλος παρατηρούνται στα 5.02 ppm διπλή κορυφή με $J = 7.2$ Hz που αντιστοιχεί στο ανωμερικό πρωτόνιο της γλυκόζης και στα 5.36 ppm διπλή κορυφή με $J = 1.8$ Hz που αντιστοιχεί στο ανωμερικό πρωτόνιο της ραμνόζης.

Δεν υπάρχει αναφορά για την ύπαρξη της ουσίας στο είδος *Adiantum capillus-veneris* από το οποίο όμως έχει απομονωθεί το παράγωγό αυτής, η ρουτίνη³²⁷. Η ναριρουτίνη έχει παραληφθεί από φυτικά είδη όπως *Thymus baicalensis* (Lamiaceae) (υπέργεια τμήματα), *Thymus sibiricus* (υπέργεια τμήματα)³⁶¹, *Thymus vulgaris* (υπέργεια τμήματα), *Mentha piperita* (ξηρά φύλλα), *Clinopodium chinense* (υπέργεια τμήματα)³⁶², *Helichrysum arenarium* (άνθη) (Compositae)³⁶³, *Citrus reticulata* (Rutaceae) (φλοιός)³⁶⁴, *Citrus sinensis*³⁶⁵ κ.ά.. Ο συγκεκριμένος μεταβολίτης έχει αξιολογηθεί σε ποικίλους βιολογικούς στόχους και έχει επιδείξει ενδιαφέρουσες δράσεις όπως μέτρια αντιοξειδωτική, νευροπροστατευτική, σημαντική κατά του Alzheimer μέσω αναστολής της συσσώρευσης Αβ αμυλοειδών³⁶⁶, αντιφλεγμονώδη, μέτρια αντιδιαβητική μέσω χαμηλής αναστολής α-γλυκοσιδάσης³⁶⁷, μέτρια κυτταροτοξική σε πολλές

σειρές όπως η A549 και η B16-4A5³⁶⁸, χαμηλή αντική έναντι H1N1³⁶⁹, χαμηλή αντιβιοτική, αντιαλλεργική πιθανά οφειλόμενη στο άγλυκο, χαμηλή υποτασική³⁶⁰ κ.ά.

ACV FR.78-84: 79 mg του κλάσματος υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με στατική φάση sephadex LH-20 και κινητή φάση MeOH:H₂O 90:10.



Εικόνα 160. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας των κλασμάτων της sephadex στο κλάσμα ACV FR.78-84. Σύστημα ανάπτυξης EtOAc/MeOH/H₂O/Formic acid 50/10/7/1

Παρελήφθησαν 201 κλάσματα όγκου 500 μL το καθένα, από τα οποία 5 συνενωμένα κλάσματα ελέγχθησαν ως προς το χημικό τους φορτίο με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

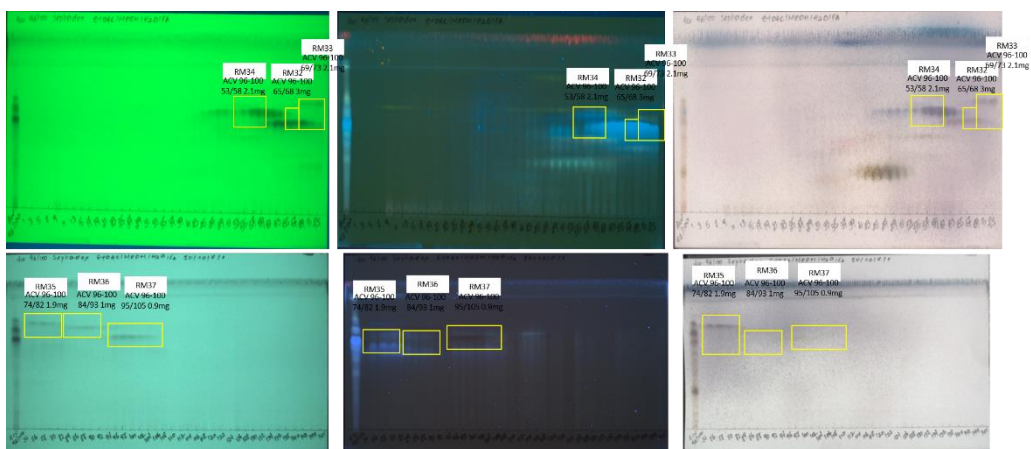
Κωδικός κλάσματος	Κωδικός NMR	Βάρος δείγματος (mg)
ACV 78-84 64/81	RM20	2.5
ACV 78-84 82/91	RM21	9.0
ACV 78-84 92/98	RM22	2.8
ACV 78-84 106/121	RM23	3.8
ACV 78-84 122/137	RM24	2.5

Στο κλάσμα RM20 παραλήφθηκε το 3-Ο-γλυκουρονίδιο της καιμπφερόλης (ACV3).

Στα κλάσματα RM21 και RM22 παραλήφθηκε μείγμα 3-Ο-γλυκουρονιδίου της καιμπφερόλης (ACV3) και 3-Ο-γλυκουρονιδίου της κερκετίνης (ACV4) σε αναλογία 2:1.

Στα κλάσματα RM23 και RM24 παραλήφθηκαν μίγματα υδρολυόμενων ταννινών.

ACV FR.96-100: 50 mg του κλάσματος υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με στατική φάση sephadex LH-20 και κινητή φάση MeOH.



Εικόνα 161. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας των κλασμάτων της sephadex στο κλάσμα ACV FR.96-100. Σύστημα ανάπτυξης EtOAc/MeOH/H₂O/Formic acid 50/10/7/1

Παραλήφθηκαν 150 κλάσματα όγκου 500 μL το καθένα, από τα οποία 6 συνενωμένα κλάσματα ελέγχθησαν ως προς το χημικό τους φορτίο με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

Κωδικός κλάσματος	Κωδικός NMR	Βάρος δείγματος (mg)
ACV 96-100 53/58	RM34	2.1
ACV 96-100 65/68	RM32	3.0
ACV 96-100 69/73	RM33	2.1
ACV 96-100 74/82	RM35	1.9
ACV 96-100 84/93	RM36	1.0
ACV 96-100 95/105	RM37	0.9

Στο κλάσμα RM34 παραλήφθηκε το *cis*-3-*O*-π-κουμαροϋλοκινικό οξύ (ACV1).

Στο κλάσμα RM32 παραλήφθηκε το νεοχλωρογενικό οξύ (ACV5).

Στο κλάσμα RM35 παραλήφθηκε μίγμα κουμαροϋλεστέρων του κινικού οξέος.

Στα κλάσματα RM36 και RM37 παραλήφθηκαν πολύπλοκα μείγματα.

13.3.7 Βιολογική αξιολόγηση καθαρών ουσιών

Πίνακας 71. % Ενζυμική αναστολή (AChE Ellman's, AChE NA-FBB, Hyal) των απομονωμένων ουσιών του εκχυλίσματος ACWC, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

	AChE Ellman's					AChE NA-FBB	Hyal
	300	100	50	5	0.5	100	100
ACV1	18.49 ±0.02	3.31 ±0.33	-4.08 ±2.21	2.76 ±3.90	1.18 ±3.19	33.66±3.53	0.44 ±1.16
ACV3	22.97 ±1.43	8.32 ±3.62	-4.42 ±0.15	-	-	25.52±1.00	11.55±1.84
RM23	86.28 ±0.20	63.67 ±0.60	55.20 ±2.65	25.84 ±2.06	5.95 ±0.81	84.96±1.32	17.03±1.74
RM30	-	13.97 ±2.16	-	-	-	-	-8.29±0.53
RM31	-	51.84 ±0.78	-	-	-	87.04±1.14	8.85±1.52

Στις δοκιμασίες αναστολής της AChE μόνο οι RM23 και RM31 επέδειξαν αξιοσημείωτη δράση και με τις δύο μεθόδους. Μάλιστα για το μεταβολίτη RM23 υπολογίστηκε η τιμή $IC_{50}=32.14 \mu\text{g/mL}$. Πιθανόν πρόκειται για υδρολυόμενες ταννίνες.

Στη δοκιμασία αναστολής της Hyal κανένας απομονωμένος δευτερογενής μεταβολίτης του είδους δεν επέδειξε αξιοσημείωτη δράση.

Οι ουσίες 7-Ο-γλυκουρονίδιο της ναρινγενίνης (ACV2), 3-Ο-γλυκουρονίδιο της κερκετίνης (ACV4), νεοχλωρογενικό οξύ (ACV5), ναριρουτίνη (ACV6) δεν αξιολογήθηκαν λόγω χαμηλής ποσότητας.

13.4 Συμπεράσματα

Το είδος *Adiantum capillus-veneris* συλλέχθηκε και εκχυλίστηκε με διαλύτες διαφορετικών πολικωτήτων. Τα παρασκευασθέντα εκχυλίσματα εμφάνισαν ενδιαφέρον φυτοχημικό προφίλ και αξιόλογη βιολογική δράση. Συγκεκριμένα το άπολο εκχύλισμα ACWA ήταν δραστικό έναντι της καρκινικής σειράς MCF-7. Ακολούθως κλασματώθηκε το υδατοαλκοολικό εκχύλισμα ACWC με την τεχνική CPC. Τα κλάσματα που προέκυψαν από αυτό αξιολογήθηκαν ως προς τους περιεχόμενους δευτερογενείς μεταβολίτες αλλά και ως προς τη βιολογική δράση, επιδεικνύοντας χαμηλή δραστικότητα στους ενζυμικούς στόχους. Μετά από

χρωματογραφικούς διαχωρισμούς απομονώθηκαν έξι δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι ανήκουν κυρίως στις κατηγορίες του χλωρογενικού οξέος και των γλυκουρονιδίων φλαβονοειδών. Κατά τη βιολογική αξιολόγηση των ουσιών, τη σημαντικότερη δράση ενάντια στην AChE εμφάνισαν οι περιεχόμενες υδρολυόμενες ταννίνες.

13.5 Βιβλιογραφία

320. Rajurkar, N. S. & Gaikwad, K. Evaluation of phytochemicals, antioxidant activity and elemental content of *Adiantum capillus veneris* leaves. *J. Chem. Pharm. Res.* 4, 365–374 (2012).
321. Khodaie, L. *et al* Essential Oil of Aerial Parts of *Adiantum capillus-veneris* : Chemical Composition and Antioxidant Activity. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products* 10, 3–7 (2015).
322. Mantpellier, C. De. *Adiantum capillus-veneris*. *Egypt. Encycl. Wild Med. Plants* 1, 1–14
323. Baskaran, X., Vigila, A. G. E. O. & Zhang, S. A review of the use of pteridophytes for treating human ailments. *J Zhejiang Univ Sci B* 19, 85–119 (2018).
324. Hussein, H. M. & Hameed, I. H. Antimicrobial Activity and Spectral Chemical Analysis of Methanolic Leaves Extract of *Adiantum capillus-veneris* Using GC-MS and FT-IR Spectroscopy. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* 8, 369–385 (2016).
325. Aali, N. M. El, Bugrein, S. N., El-fellah, M. F., Elmhdwi, M. F. & Layas, Y. F. Determination of the Total Phenolic and Flavonoid in Various Extracts of *Adiantum capillus veneris* Linn , as well as their Radical Scavenging Activity. *Acta Scientific Microbiology* 1, 4–9 (2018).
326. Nilforoushadeh, M. A., Javanmard, S. H. & Ghanadian, M. The Effects of *Adiantum capillus-veneris* on Wound Healing : An Experimental In Vitro Evaluation. *Int J Prev Med* 5, 1261-1268 (2014).
327. Ibraheim, Z. Z., Ahmed, A. S. & Gouda, Y. G. Phytochemical and biological studies of *Adiantum*. *Saudi Pharm. J.* 19, 65–74 (2011).
328. Lusanna, A. *et al*. Asymmetry Synthesis of p-coumaroylquinic acids and analysis of their interconversion. *Tetrahedron Lett.* 28, 419–427 (2017).
329. Yuan, Q., Wang, J. & Ruan, J. Screening for Bioactive Compounds from *Adiantum capillus – veneris* L . *Journal-Chemical Society of Pakistan* 34, 207–216 (2012).
330. Olennikov, D. & Kashchenko, N. I. New Isorhamnetin Glycosides and other Phenolic Compounds from *Calendula officinalis*. *Chemistry of Natural Compounds* 49, 833-840 (2013). doi:10.1007/s10600-013-0759-x
331. Monaco, P. *et al* Antioxidant Properties of Sour Cherries (*Prunus cerasus* L.): Role of Colorless Phytochemicals from the Methanolic Extract of Ripe Fruits. *J Agric Food Chem* 56, 1928–1935 (2008).
332. Kowalczyk, M. *et al* Novel Phenolic Constituents of *Pulmonaria officinalis* L . LC-MS / MS Comparison of Spring and Autumn Metabolite Profiles. *Molecules* 23, 1–32 (2018).

doi:10.3390/molecules23092277

333. Tagashira, M., Kanda, T. & Shibusawa, Y. Comprehensive Separation and Structural Analyses of Polyphenols and Related Compounds from Bracts of Hops (*Humulus lupulus* L.). *J Agric Food Chem* 62, 2198-2206 (2014).
334. Jaiswal, R. *et al.* Identification and characterization of chlorogenic acids, chlorogenic acid glycosides and flavonoids from *Lonicera henryi* L. (Caprifoliaceae) leaves by LC – MSn. *Phytochemistry* 108, 252-263 (2014). doi:10.1016/j.phytochem.2014.08.023
335. Kim, K.H., Kim, Y.H. & Lee, K.R. Isolation of quinic acid derivatives and flavonoids from the aerial parts of *Lactuca indica* L. and their hepatoprotective activity in vitro. *Bioorg Med Chem Lett* 17, 6739–6743 (2007).
336. Kimpe, D. Caffeoylquinic acid derivatives isolated from the aerial parts of *Gynura divaricata* and their yeast α -glucosidase and PTP1B inhibitory activity. *Fitoterapia* 99, 1-6 (2014). doi:10.1016/j.fitote.2014.08.015
337. Karaalp, C., Ballar, P. & Bedir, E. Phenolic Glycosides with antiproteasomal activity from *Centaurea urvillei* DC. subsp. *urvillei*. *Carbohydr Res* 345, 2529–2533 (2010).
338. Klaiklay, S., Sukpondma, Y., Rukachaisirikul, V., Hutadilok-tawatana, N. & Chareonrat, K. Flavanone glucuronides from the leaves of *Garcinia prainiana*. *Canadian Journal of Chemistry* 89, 461–464 (2011).
339. Spigoni, V. *et al.* Bioavailability of Bergamot (*Citrus bergamia*) Flavanones and Biological Activity of Their Circulating Metabolites in Human Pro-Angiogenic Cells. *Nutrients* 9, 1328 (2017) doi:10.3390/nu9121328
340. Lawal, MF, Olotu, FA, Agoni, C, Soliman, ME Exploring the C-terminal tail dynamics: Structural and molecular perspectives into the therapeutic activities of novel CRMP-2 inhibitors, Naringenin and Naringenin-7-O-glucuronide, in the treatment of Alzheimer’s disease. *Chem Biodivers* 15:e1800437 (2018) doi:10.1002/cbdv.201800437
341. Taira, N., Cao, B., Nguyen, Q. & Tawata, S. Hair Growth Promoting and Anticancer Effects of p21-activated kinase 1 (PAK1) Inhibitors Isolated from Different Parts of *Alpinia zerumbet*. *Molecules* 22, 1–10 (2017).
342. Abdul, L. & Sumbul, R. Pharmacognostical , Phyto-Chemical and Antibacterial Studies of Some Unani Drugs used in Infectious Diseases. *International Journal of Pharmacognosy and Chinese Medicine* 1, 1–11 (2017).
343. Pan, C., Chen, YG, Ma, XY, Jiang, JH, He, F, Zhang, Y Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of Plants from the Genus *Adiantum* : A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 10, 681–692 (2011).
344. Quispe, YNG, Hwang, SH, Wang Z, Lim, SS Screening of Peruvian Medicinal Plants for Tyrosinase Inhibitory Properties : Identification of Tyrosinase Inhibitors in *Hypericum laricifolium* Juss. *Molecules* 22 (2017). doi:10.3390/molecules22030402
345. Xie, J. *et al.* Protective effect of flavonoids from *Cyclocarya paliurus* leaves against carbon

- tetrachloride-induced acute liver injury in mice. *Food Chem. Toxicol.* 119, 392–399 (2018).
346. Hiermann, A., Schramm, H. W. & Laufer, S. Anti-inflammatory activity of myricetin-3-O- β -D-glucuronide and related compounds. *Inflamm. Res.* 47, 421–427 (1998).
 347. Granica, S., Czerwi, M. E., Barbara, Ž. & Kiss, A. K. Antioxidant and anti-inflammatory flavonol glucuronides from *Polygonum aviculare* L. *Fitoterapia* 91, 180–188 (2013).
 348. Brahmachari, G., & Brahmachari, A. K. Phytochemicals and Biological Activities of *Adiantum* Species. *Journal of scientific and industrial research* 62, 1119-1130 (2003).
 349. Olennikov, D. N., Kashchenko, N. I., Chirikova, N. K. & Kuz, S. S. Phenolic Profile of *Potentilla anserina* L. (Rosaceae) Herb of Siberian Origin and Development of a Rapid Method for Simultaneous Determination of Major Phenolics in *P. anserina* Pharmaceutical Products by Microcolumn RP-HPLC-UV. *Molecules* 24, 224–248 (2014). doi:10.3390/molecules20010224
 350. Abouzid, S. F., Ali, SA., & Choudhary, MI. A New Ferulic Acid Ester and Other Constituents from *Tamarix nilotica* Leaves. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 57, 740–742 (2009).
 351. Renda, G. *et al.* α -Glucosidase inhibitory effects of polyphenols from *Geranium asphodeloides*: Inhibition kinetics and mechanistic insights through *in vitro* and *in silico* studies. *Bioorganic Chemistry* 81, 545-552 (2018). doi:10.1016/j.bioorg.2018.09.009
 352. Ganchimeg, D., Batbold, B., Murata, T., Ochir, B. & Tserendorj, D. Flavonoids isolated from the flowers of *Pulsatilla flavescens* and their anti-piroplasm activity. *J. Nat. Med.* 73, 633-640 (2019). doi:10.1007/s11418-019-01294-8
 353. Chuang, C. *et al.* Quercetin metabolites inhibit MMP-2 expression in A549 lung cancer cells by PPAR- γ associated mechanisms. *J. Nutr. Biochem.* 33, 45-53 (2016). doi:10.1016/j.jnutbio.2016.03.011
 354. Butterweck, V., Jürgenliemk, G., Nahrstedt, A. & Winterhoff, H. Flavonoids from *Hypericum perforatum* Show Antidepressant Activity in the Forced Swimming Test. *Planta Med* 66, 3–6 (2000).
 355. Nakatani, N., Kayano, S., Kikuzaki, H., Sumino, K. & Katagiri, K. Identification, Quantitative Determination, and Antioxidative Activities of Chlorogenic Acid Isomers in Prune (*Prunus domestica* L.). *J Agric Food Chem* 48, 5512–5516 (2000). doi:10.1021/jf000422s
 356. Braca, A. *et al* Quali-quantitative Analyses of Flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) Fruits. *J Agric Food Chem* 56, 3377–3380 (2008).
 357. Wang, F. *et al.* Profiling and identification of chlorogenic acid metabolites in rats by ultra-high-performance liquid chromatography coupled with linear ion trap-Orbitrap mass spectrometer ultra-high-performance liquid chromatography coupled with linear ion. *Xenobiotica* 48, 605–617 (2018).
 358. Kapepula, P. M. *et al.* Comparison of metabolic profiles and bioactivities of the leaves of three edible Congolese *Hibiscus* species. *Nat. Prod. Res.* 31, 2885-2892 (2017).
 359. Kusuda, M. *et al.* Polyphenolic Constituent Structures of *Zanthoxylum piperitum* Fruit and the Antibacterial Effects of Its Polymeric Procyanidin on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* *Biosci Biotechnol Biochem* 70, 1423-1431 (2014).

360. Matsubara, Y. *et al.* Structure and Hypotensive Effect of Flavonoid Glycosides in *Citrus unshiu* Peelings. *Agricultural and Biological Chemistry* 49, 909-914 (2014).
361. Chirikova, N. K., Olennikov, D. N., Station, S. & Alto, P. Phenolic compounds from Siberian species *Thymus baicalensis* and *T. sibiricus*. *Chemistry of Natural Compounds* 54, 572–576 (2018).
362. Zhong, M. *et al.* A New Prenylated Naphthoquinoid from the Aerial Parts of *Clinopodium chinense* (Benth.) O. Kuntze. *Molecules* 17, 13910–13916 (2012). doi:10.3390/molecules171213910
363. Mao, Z. *et al.* Anti-atherosclerotic activities of flavonoids from the flowers of *Helichrysum arenarium* L. MOENCH through the pathway of anti-inflammation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 27, 2812–2817 (2017).
364. Phetkul, U. & Phongpaichit, S. New depside from *Citrus reticulata* Blanco. *Natural Product Research* 28, 945-951 (2014). doi:10.1080/14786419.2014.896010
365. Mouly, P. P., Gaydou, E. M., Faure, R. & Estienne, J. M. Blood Orange Juice Authentication Using Cinnamic Acid Derivatives . Variety Differentiations Associated with Flavanone Glycoside Content. *J Agric Food Chem* 45, 373–377 (1997).
366. Chakraborty, S. & Basu, S. Multi- functional activities of citrus flavonoid narirutin in Alzheimer 's disease therapeutics : An integrated screening approach and in vitro validation. *Int. J. Biol. Macromol.* 103, 733-743 (2017). doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.05.110
367. Ah, H., Paudel, P., Hui, S., Min, B. & Sue, J. Structure-related protein tyrosine phosphatase 1B inhibition by naringenin derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 27, 2274–2280 (2017).
368. Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E. & Ogawa, K. Antiproliferative Activity of Flavonoids on Several Cancer Cell Lines. *Biosci Biotechnol Biochem* 63, 896-899, (1999).
369. Kim, HK., Jeon, WK., Ko, BS. Flavanone Glycosides from *Citrus junos* and their Anti-Influenza Virus Activity. *Planta Med* 67, 548–549 (2000).
370. Chen, J. *et al.* Caffeoylquinic acid derivatives isolated from the aerial parts of *Gynura divaricata* and their yeast α -glucosidase and PTP1B inhibitory activity. *Fitoterapia* 99, 1–6 (2014).
371. Lu, Y., Sun, Y., Foo, L. Y., Mcnabb, W. C. & Molan, A. L. Phenolic glycosides of forage legume *Onobrychis viciifolia*. *Phytochemistry* 55, 67–75 (2000).

14 *Paeonia parnassica* (Paeoniaceae)

14.1 Σκοπός

Το είδος *Paeonia parnassica* επιλέχθηκε να μελετηθεί φυτοχημικά και να αξιολογηθεί ως προς τις βιολογικές του ιδιότητες, αφενός λόγω των αναφορών που εντοπίζονται στα υπό μελέτη κείμενα της παρούσας διατριβής και αφετέρου λόγω του ενδημισμού του, των ελάχιστων πληροφοριών που υπάρχουν σχετικά με το χημικό φορτίο και τις θεραπευτικές ενδείξεις του, αλλά και του μεγάλου ενδιαφέροντος που παρουσιάζουν άλλα είδη της οικογένειας. Επίσης, τα εκχυλίσματα που παρελήφθησαν εμφάνισαν πλούσιο φυτοχημικό προφίλ και αξιόλογα αποτελέσματα στις βιοδοκιμασίες στις οποίες υποβλήθηκαν. Συγκεκριμένα αξιολογήθηκε η κυτταροτοξικότητά τους σε τρεις ανθρώπινες καρκινικές σειρές και μια φυσιολογική, καθώς η αντιογκογόνος δράση συγγενών ειδών αναφέρεται στη λαϊκή θεραπευτική της Κίνας και των γειτονικών χωρών και πλέον υπάρχουν αρκετές σύγχρονες μελέτες σχετικές με αυτή την ιδιότητα της παιώνιας. Επίσης, αξιολογήθηκε η ικανότητα των αρχικών εκχυλισμάτων και των κλασμάτων που προέκυψαν από τα υδατομεθανολικά εκχυλίσματα του είδους, να αναστέλλουν τα ένζυμα AChE και Hyal, τα οποία εντοπίζονται στο δηλητήριο των όφρων και εμπλέκονται σε μια σειρά παθολογικών καταστάσεων.

14.2 Θεωρητικό Μέρος

14.2.1 Αναφορές της δρόγης στα υπό μελέτη κείμενα

Ο Νίκανδρος αναφέρει στους στίχους 934-956 των *Θηριακών* (τελευταίοι στίχοι πριν τον επίλογο) τη ρίζα του φυτού γλυκουσίδη ως ένα από τα υλικά μιας πολύπλοκης συνταγής, η οποία περιέχει πολλά φυτικά είδη και χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση των περισσότερων παθήσεων (ιάματα για όλες τις συμφορές). Σύμφωνα με το Μέγα Λεξικόν της Ελληνικής Γλώσσας του Δημητράκου (τόμος Δ, σελίδα 1649) το φυτό γλυκουσίδη είναι η παιώνια.

Νίκανδρος Αρχαίο Κείμενο 934-956

Ὅφρα δὲ καὶ πάσῃσιν ἀλεξητήριον ἄταις
τευξάμενος πεπύθειο, τό τοι μέγα κρήγυον ἔσται
ἦμος ὅτε θρόνα πάντα μῆ ὑπὸ χειρὶ ταράξης,
ἐν μὲν ἀριστολόχεια, καὶ ἴριδος ἐν δὲ τε νάρδου
ρίζαι, χαλθανίδες τε σὺν αὐαλέοισι πυρέθροις
εἶεν, δαυκίου τε παναλθέος, ἐν δὲ θρυώνης,
σὺν δὲ τε ρίζα χαῦνα νεωρυχέος γλυκυσίδης...

Νίκανδρος Μετάφραση 934-956

Θα σου μάθω τώρα πώς να παρασκευάζεις ιάματα
για όλες τις συφορές, και αυτό πολύ ωφέλιμο για σένα θα 'ναι,
καθώς με το ίδιο σου το χέρι όλα τα βοτάνια τα θεραπευτικά
θα μαζεύεις και φάρμακα θα φτιάχνεις. Σε δοχείο μέσα βάλε
ρίζες δρακόχορτου, ίριδας και βαλεριανής, κομμοερητίνη
του άρτηκα, φυλλαράκια παρθένιου πύρεθρου μα και
του σταφυλίνακα, που όλα τα γιατρεύει. Βάλε κι αγριόκλημα,
ριζούλες παιώνιας...

Εικόνα 162. Απόσπασμα αναφοράς της παιώνιας στο έργο Θηριακά του Νικάνδρου

Ο Διοσκουρίδης στο *Περί Ιατρικής Ὑλης* και συγκεκριμένα στην παράγραφο 140 του τρίτου βιβλίου (3.140) (Λόγος Τρίτος) αφού διαχωρίσει την αρσενική από τη θηλυκή παιώνια, κάνει αναφορά στη χρήση της γλυκυσίδης (ρίζα παιώνιας) συνήθως υπό μορφή αφεψήματος ενάντια σε γαστρεντερικές διαταραχές, τον ίκτερο και διάφορα γυναικολογικά προβλήματα. Οι σπόροι του φυτού βοηθούν στη διακοπή της εκτεταμένης αιμορραγίας στη γυναίκα, σε στομαχικά προβλήματα και στην αποφυγή σχηματισμού λίθων στα νεφρά των παιδιών. Συγκεκριμένα, οι μαύροι σπόροι του φυτού όταν ληφθούν σε νερό με μέλι ή κρασί συμβάλλουν στην αντιμετώπιση πόνων κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Τέλος, υπάρχει αναφορά στη χρήση του βοτάνου ενάντια στις δηλητηριάσεις.

Ο Ιερόπαιδας δεν αναφέρει τη χρήση της παιώνιας έναντι κάποιας μορφής κακοήθειας. Ωστόσο, η ύπαρξη πληθώρας εθνοφαρμακολογικών και σύγχρονων πληροφοριών σχετικών με τη θεραπευτική χρήση της παιώνιας σε διάφορους τύπους κακοήθειας οδήγησε στην αξιολόγηση των εκχυλισμάτων ως προς την κυτταροτοξική τους δράση. Τα σπλιβένια των σπερμάτων και τα μονοτερπένια των ριζών φαίνεται να είναι τα υπεύθυνα βιοδραστικά συστατικά^{372 373 374 375 376}

³⁷⁷.

14.2.2 Δρογοβοτανική-Γεωγραφική Εξάπλωση-Βιότοπος

Η **οικογένεια** *Raeoniaceae* αποτελείται μόνο από το **γένος** *Raeonia*, με 35 είδη κατανεμημένα σε Ευρώπη, Δυτική Ασία, Δυτική Κίνα και δύο απομονωμένα είδη στην Αμερική³⁷⁸. Υπάρχουν τρεις ομάδες (sections) του γένους *Raeonia*: section *Mountan* με 8 ξυλώδη είδη τα

οποία απαντώνται σε μικρή περιοχή της Κίνας, section *Onaeria* με μόνο δύο εκπροσώπους στην βορειοδυτική Αμερική και τα υπόλοιπα 25 είδη συνιστούν το section *Raeonia*, το οποίο είναι το μεγαλύτερο και εξαπλώνεται στην εύκρατη Ευρασία. Συγκεκριμένα στην Ευρώπη και τη Μεσόγειο, η Ελλάδα συνιστά κέντρο κατανομής και ποικιλομορφίας του γένους, το οποίο εκπροσωπείται εξίσου τόσο στην κεντρική χώρα όσο και στα πιο απομονωμένα μέρη. Τα είδη του γένους *Raeonia* που συναντώνται στον ελλαδικό χώρο εμφανίζουν διαφορές ως προς το χρώμα των ανθέων (λευκές, λευκές-ροζ, ροζ, κόκκινες, μωβ παιώνιες), τον αριθμό και το σχήμα φυλλαρίων, το τρίχωμα του βλαστού και των φύλλων, αλλά και τη μορφή του ριζώματος. Μέχρι σήμερα απαριθμούνται εννέα taxa παιώνιας στην Ελλάδα, πέντε είδη και τέσσερα υποείδη, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνεται πάνω από το 50% των ευρωπαϊκών ειδών, ένα ποσοστό το οποίο είναι εξαιρετικά μεγάλο αν λάβουμε υπόψη το μικρό μέγεθος της χώρας. Τα ελληνικά ενδημικά είδη είναι τα εξής: *Raeonia parnassica* Tzanoud., *P. clusii* Stern subsp. *clusii*, *P. clusii* subsp. *rhodia* (Stearn) Tzanoud. και *P. mascula* subsp. *hellenica* Tzanoud. Τα είδη του γένους *Raeonia* κατανέμονται και στα 13 φυτογεωγραφικά αθροίσματα της χώρας²⁹¹. Τα μέλη της οικογένειας *Raeoniaceae* είναι μεγάλες πολυετείς πόες ή κάποιες φορές θαμνώδη φυτά, ύψους μέχρι περίπου τα δύο μέτρα, τα οποία αναπτύσσονται από παχιά ριζώματα. Τα φύλλα είναι λίγα, μεγάλα, αναπτύσσονται κατ' εναλλαγήν και διαχωρίζονται σε δύο, τρεις ή περισσότερους λοβούς, ενώ ο κάθε λοβός διαχωρίζεται περαιτέρω σε τρεις ακόμη μικρότερους λοβούς. Τα άνθη είναι επάκρια, ακτινόμορφα, ερμαφρόδιτα και μεγάλα, ως επί το πλείστον μονήρη, 6-15 cm σε εγκάρσια διατομή, υποσφαιρικά έως δισκοειδή, με ένα μειωμένο φυλλάριο αμέσως κάτω από τον κάλυκα. Φέρει 3-7 σέπαλα, ελεύθερα, άνισα και 5-13 πέταλα, ελεύθερα, λευκά, ρόδινα ή ερυθρά. Οι στήμονες είναι πολυάριθμοι, σπειροειδώς τοποθετημένοι και οι ανθήρες κίτρινοι. Κάποια καλλιεργούμενα είδη έχουν αναπτυχθεί με περισσότερα από 10 πέταλα. Τα θηλυκά μέρη του φυτού απαντώνται στα ανώτερα τμήματα και αποτελούνται από δύο έως πέντε ξεχωριστούς, μεγάλους, περισσότερο ή λιγότερο χυμώδεις ύπερους ή ωσθήκες. Οι τελευταίες περιέχουν αρκετές σπερματικές βλάστες, οι οποίες στη συνέχεια εξελίσσονται σε μεγάλα σπέρματα, τα οποία αρχικά είναι κόκκινου χρώματος, ακολούθως αποκτούν ένα λαμπερό μαύρο χρώμα και φέρουν μια χυμώδη απόφυση που ονομάζεται περικάρπιο. Τα καρπόφυλλα είναι (1-)2-5(-8), ελεύθερα, χνοώδη, εισερχόμενα μέσα στον σαρκώδη δίσκο, το στίγμα σχεδόν επιφυές, λείο, κυρτό, πορφυρό. Ο καρπός αποτελεί μια ομάδα οριζοντίως απλωτών θυλάκων με τα σπέρματα σε 2 σειρές. Τα σπέρματα είναι μεγάλα, ευρέως ελλειψοειδή έως υποσφαιρικά, μελανά, στίλβοντα.

Το οικονομικό ενδιαφέρον γύρω από την οικογένεια εστιάζεται σε καλλωπιστικά είδη παιώνιας, των οποίων τα εντυπωσιακά μεγάλα άνθη αναπτύσσονται σε ένα ευρύ φάσμα μορφών και χρωμάτων. Ωστόσο, κάποια είδη παιώνιας της νότιας Ευρώπης και Ασίας καλλιεργούνται επίσης για διατροφικούς και θεραπευτικούς σκοπούς.

Το **είδος** παιώνια η παρνασσική, *Paeonia parnassica* Tzanoud., Kyttarotax., 1984 (συνώνυμα είδη: *Paeonia peregrina* var. *latifolia* Boiss., *Paeonia arietina* auct. fl. graec., non G. Anderson¹⁷³) περιγράφηκε για πρώτη φορά σχετικά πρόσφατα, το 1977, από τον καθηγητή Τζανουδάκη Δ.³⁸⁰, είναι ενδημικό είδος και απαντάται μόνο στα όρη Παρνασσός και Ελικώνας (Στερεά Ελλάδα). Ο πληθυσμός του συγκεκριμένου φυτού αποτελείται από περίπου 2.500 άτομα, με υποπληθυσμούς όχι μεγαλύτερους των 200 ατόμων. Είναι ίσως η πιο σπάνια ελληνική παιώνια. Η *P. parnassica* είναι ένα αυτοφυές, πολυετές, ριζωματώδες αγριολούλουδο. Συναντάται σε μεγάλα υψόμετρα (800-1300 m), στις νοτιοδυτικές πλαγιές των προαναφερθέντων ορέων, σε υγρά και χλοερά λιβάδια που σχηματίζονται ανάμεσα σε δάση κεφαλληνιακής ελάτης, ιδιαίτερα σε δολίνες και εδάφη με κλίση. Έχει εντοπισθεί στη βάση βραχωδών ασβεστολιθικών σχηματισμών. Το κύριο ρίζωμα δεν είναι αρκετά ισχυρό ενώ τα πλευρικά ριζώματα φέρουν κονδυλόμορφες διογκώσεις. Ο βλαστός της αρχικά είναι κοκκινωπός και έντονα τριχωτός, ενώ μετά γίνεται πράσινος, παραμένει τριχωτός και αποκτά μήκος 30-65 cm. Τα φύλλα της είναι σύνθετα, δις τρισχιδή, διηρημένα σε 9-13, δευτερογενή φυλλάρια και λοβούς, αντρωειδή έως ελλειπτικά ή πλατέως λογχοειδή, οξύληκτα, στην άνω επιφάνεια πράσινα, στην κάτω επιφάνεια φαιοπράσινα και πυκνώς τριχωτά. Τα άνθη έχουν διάμετρο 9-12 cm και είναι ισχυρώς κοίλα. Τα σέπαλα είναι 3-5, χνοώδη, σχεδόν ισομεγέθη και έχουν εύρος 1-2 cm. Τα πέταλα ποικίλουν σε αριθμό (9-12), είναι αντρωειδή έως αντρωειδή-δισκοειδή, μελανοπόρφυρα. Οι στήμονες είναι πολυάριθμοι, μήκους 1.5 cm με νήματα ανθήρων πορφυροϊώδη και ανθήρες κίτρινους. Ο καρπός αποτελείται από χνοώδεις θυλάκους σε σχήμα αμυγδαλού, οι οποίοι είναι γεμάτοι με μεγάλα στρογγυλά κόκκινα και μαύρα άγονα σπέρματα. Ο στύλος είναι βοστρυχοειδής, με περιοχή στίγματος σχεδόν από την βάση του, πλάτους 1.5 mm³⁸¹. Η ανθοφορία του είδους διαρκεί περίπου 2-3 εβδομάδες, από τα τέλη του Απριλίου έως και τον Μάιο. Γενικά ένα φυτό που πολλαπλασιάζεται από τους μαύρους σπόρους θα ανθίσει σε 4-5 χρόνια.

Ταξινομικά σχόλια: Η *Paeonia parnassica* αποτελεί ένα ιδιαίτερος ευδιάκριτο είδος, όχι μόνο μεταξύ των ελληνικών ειδών, αλλά και εντός του γένους *Paeonia*. Διαφέρει από το συγγενές

είδος *Paeonia peregrina* ως προς τη μορφή των φύλλων και την παρουσία τρίχωσης σε βλαστό, μίσχο, σέπαλα και κάτω επιφάνεια φύλλων. Το μελανοπόρφυρο χρώμα των ανθέων τη διακρίνει από οποιοδήποτε άλλο είδος *Paeonia* της Ελλάδας.

Η συστηματική κατάταξη σύμφωνα με το σύστημα που έχει υιοθετήσει το USDA (United States Department of Agriculture) (<https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=PAEON>) είναι η ακόλουθη:

Πίνακας 72. Συστηματική κατάταξη του είδους *Paeonia parnassica*

Βασίλειο (Kingdom)	Φυτά (<i>Plantae</i>)
Υποβασίλειο (Subkingdom)	Τραχεόφυτα (<i>Tracheobionta</i>)
Υπεράθροισμα (Superdivision)	Σπερματοφύτα (<i>Spermatophyta</i>)
Άθροισμα (Division)	Ανθοφόρα φυτά (<i>Magnoliophyta</i>)
Κλάση (Class)	Δικοτυλήδονα (<i>Magnoliopsida</i>)
Υποκλάση (Subclass)	<i>Dilleniidae</i>
Τάξη (Order)	<i>Dilleniales</i>
Οικογένεια (Family)	Paeoniaceae
Γένος (Genus)	<i>Paeonia</i> L.
Είδος (Species)	<i>Paeonia parnassica</i> Tzanoud.



Εικόνα 163. Το είδος *Paeonia parnassica*

Το είδος αυτό της παιώνιας περιλαμβάνεται στα φυτικά είδη που απειλούνται με κίνδυνο εξαφάνισης σύμφωνα με την Διεθνή Ένωση Προστασίας της Φύσης (IUCN)^{381 382}. Φέρει τη σήμανση τρωτό είδος στο βιβλίο ερυθρών δεδομένων των σπάνιων και απειλούμενων φυτών της Ελλάδας³⁸³. Λόγω της ιδιαίτερα ελκυστικής εικόνας του συγκεκριμένου αγριολούλουδου, συνηθίζεται να συλλέγονται είτε τα ριζώματά του, είτε ολόκληρο το φυτό για την καλλιέργειά

του σε κήπους. Το γεγονός αυτό αποτελεί υπαρκτό κίνδυνο για την μείωση των πληθυσμών του. Στις αιτίες αλόγιστης συλλογής του είδους θα πρέπει να προστεθεί η εύκολη πρόσβασή του από τους συλλέκτες και η εντυπωσιακή παρουσία των μελανοπόρφυρων ανθέων. Πρακτικώς, δεν έχει ληφθεί κανένα ειδικό μέτρο προστασίας του είδους, εκτός από την ένταξη κάποιων μικρών περιοχών του όρους Παρνασσού, όπου φύεται η *P. parnassica*, στην οδηγία 92/43 της Ε.Ε. (Natura 2000) των οικολογικώς σημαντικών περιοχών της Ελλάδας. Κρίνεται αναγκαία η λήψη αυστηρών μέτρων και η εξασφάλιση νομικής προστασίας του είδους ώστε να περιοριστεί η μείωση των πληθυσμών και να ενισχυθεί ο αριθμός των ατόμων.

14.2.3 Δρογοϊστορία-Δρογοετυμολογία



Το όνομα του φυτού φαίνεται ότι προέρχεται από το μαθητή του Ασκληπιού, γιού του Απόλλωνα και θεού της Ιατρικής, του οποίου το όνομα 'Παιών' (ή Παιώνων επικά) εντοπίσθηκε σε πινακίδες της Κνωσσού. Σύμφωνα με τη μυθολογία, η μητέρα του Απόλλωνα και θεά της γονιμότητας, Λητώ, φανέρωσε στον Παιώνα μια μαγική ρίζα η οποία φύονταν στον Όλυμπο και μαλάκωνε τους πόνους των γυναικών κατά τον τοκετό. Ο Ασκληπιός ζήλεψε και αποπειράθηκε να σκοτώσει το μαθητή του. Ο Δίας όμως τον έσωσε από την οργή του Ασκληπιού μετατρέποντάς τον στο άνθος της παιώνιας. Η ιστορία του συγκεκριμένου φυτού έχει βαθιές ρίζες που φτάνουν μέχρι τον Όμηρο, ο οποίος στην πέμπτη ραψωδία της Ιλιάδας (Ε, 401) αναφέρει ότι ο Παιών στον Όλυμπο χρησιμοποιώντας μαλακτικά φάρμακα θεράπευσε τον Άρη ο οποίος τραυματίστηκε από το Διομήδη με βέλος στον ώμο και τον Άδη κατά τη μάχη της Τροίας. Σε παλιό διδακτικό ποίημα (3^{ος} αιώνας μ.Χ.) η παιώνια παρουσιάζεται ως η βασίλισσα των βοτάνων, χαρακτηρισμός που οφείλεται τόσο στο επιβλητικό της άνθος όσο και στις πολλαπλές φαρμακευτικές της ιδιότητες. Μάλιστα, στο ίδιο έργο επισημαίνεται ότι οι θεοί παρέδωσαν το βότανο στον Απόλλωνα ως φάρμακο κατάλληλο για όλες τις παθήσεις. Με το προσωνύμιο 'Παιών' αναφέρονται και ο Ζευς και ο Απόλλωνας ο οποίος κατέχει την ανώτερη βαθμίδα θεραπευτικής δύναμης στη θεϊκή τάξη «Συ είσαι ο πιο κατάλληλος γιατρός και ο Απόλλωνας Παιάνας τιμά το φως σου», (Πίνδαρου, Πύθιαι Ωδαί, 4 επ. 12). Είναι λοιπόν πιθανόν ο όρος 'Παιών' να συνιστά την πηγή της θεραπευτικής τέχνης. Άλλωστε η θεραπευτική τέχνη ονομάστηκε «παιωνιάς σοφία» και ο ευχαριστήριο ύμνος προς το λυτρωτή Απόλλωνα ονομάστηκε 'παιών' ή 'παιάν', ο παιάνας.

Επίσης η θεά Αθηνά ονομαζόταν Παιανία. Η παιώνια (πηγουνιά) συναντάται ακόμη στο μαγικό άλσος της Εκάτης όπου της αποδίδονταν μαγικές δυνάμεις³⁸⁴.

Ο Ιπποκράτης (460-377 π.Χ.) στο έργο του *Περί φυτών ιστορίας* αναφέρει την παιώνια ως βότανο με αντισπασμωδικές ιδιότητες για την αντιμετώπιση της επιληψίας και άλλων νευρολογικών παθήσεων. Είναι επίσης γεγονός ότι οι σπόροι της παιώνιας χρησιμοποιούνταν από τις έγκυες γυναίκες στην αρχαιότητα. Ο Θεόφραστος (371 π.Χ. – περ. 287/5 π.Χ) (9.8.6) κατέταξε την 'πηγουνιά' στα φαρμακευτικά φυτά των οποίων η συλλογή ακολουθεί ορισμένους κανόνες. Τόνισε ότι κατά την εκσκαφή της ρίζας είναι πιθανό ο συλλέκτης να υποστεί βουβωνοκήλη, υπαινίσσοντας το μεγάλο βάθος που πρέπει να σκάψει κανείς για την παραλαβή της ρίζας. Ο Διοσκουρίδης (1^{ος} αιώνας μ.Χ.) στο έργο του *Περί ιατρικής ύλης* (απόσπασμα 3.140) δίνει μια εύστοχη και την πληρέστερη βοτανική περιγραφή του φυτού με τα παλαμοειδή φύλλα και τους μακρουλούς καρπούς που έχουν 5 ή 6 μαύρους σπόρους στο κέντρο και τους άλλους κόκκινους. Επίσης αναφέρει περίπου 18 συνώνυμα του φυτού, όπως αγλαοφώτιδα, θεοδώρητον, κ.ά. καθώς και τις θεραπευτικές χρήσεις του. Για παράδειγμα σε κρίσεις υστερίας συστήνει σπόρους παιώνιας λιωμένους σε μέλι ή κρασί, ενώ για τους πόνους νεφρών και κύστης ένα αφέψημα²⁵. Ο Πλίνιος (23-79 μ.Χ.) (25.4) αναφέρει την πηγουνιά ως φυτό των δασωμένων βουνών, ενώ προβληματίζεται για το διαφορετικό χρώμα των σπόρων της συνιστώντας τους κόκκινους σαν αιμοστατικό και τους μαύρους για γυναικολογικές παθήσεις.

Αυτή λοιπόν είναι η μυθική και ιστορική αφετηρία για το φυτό αυτό που χρησιμοποιήθηκε ως φαρμακευτικό σε όλο τον αρχαίο κόσμο από την Ελλάδα, τη Ρώμη και στη συνέχεια στο Βυζάντιο, αλλά και στην Αναγέννηση ακόμα και στους νεότερους χρόνους και έγινε ένα είδος συμβόλου της θεραπευτικής τέχνης.

Όσον αφορά στην ετυμολογία του Παιώνος και της παιώνιας υπάρχουν δύο εκδοχές: είτε ότι μπορεί να προέρχεται από τη λέξη παίω=κτυπώ, "ότε ο Απόλλων εφόνευσε παίσας τον εν Δελφοίς Πύθωνα δράκοντα" είτε με τη σημασία του παύω, καταπολεμώ δηλαδή τις ασθένειες, με την έννοια του σωτήρα.

Συναντάμε την παιώνια με πολλά διαφορετικά κοινά ονόματα σε διάφορες περιοχές, όπως αγριοροδαρά στο Λασιθί, ψευθιά στα Λευκά Όρη, νεράιδα στην Ζάκυνθο, αλουπόχορτο, ψατσί και αρκοψατσί στην Κύπρο, ενώ είναι ευρύτερα γνωστή ως μάκος, ξυφιλίνη, αγλαοφύτης, ψιφιδέλι, ψηφακιά, ρόδο του βουνού, λυγουνιά, πηγωνιά, πηγουνιά³⁸⁵.

Στην Ελλάδα η διακεκριμένη βοτανική ζωγράφος Νίκη Γουλανδρή και Πρόεδρος του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας έχει επιδείξει ξεχωριστό ενδιαφέρον για τις παιώνιες. Έχει δώσει στο κοινό μια θαυμάσια έκδοση που χαρακτηρίζεται ως ταξινομική και ιστορική μελέτη του γένους *Raeonia* η οποία, περιλαμβάνει έγχρωμες αναπαραστάσεις του φυτού παιώνια³⁸⁶.

14.2.4 Δρογοχημεία

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει εκτενής βιβλιογραφία ως προς τη φυτοχημεία του είδους που μελετήθηκε στην παρούσα διατριβή, πέρα από δύο δημοσιεύσεις που αφορούν στη ρίζα³⁸⁷³⁸⁸. Συνεπώς στην ενότητα αυτή αναφέρονται οι μεταβολίτες του γένους. Γενικά στο γένος *Raeonia* έχουν πραγματοποιηθεί πολυάριθμες μελέτες που οδήγησαν στην απομόνωση 262 βιοδραστικών προϊόντων³⁷⁸ και τα οποία ανήκουν σε 6 κατηγορίες: μονοτερπένια και μονοτερπενικοί γλυκοσίδες, τριτερπένια και στεροειδή, στυλβένια, φαινόλες, φλαβονοειδή και ταννίνες³⁸⁹.

Μονοτερπένια και Μονοτερπενικοί γλυκοσίδες

Τα τερπένια ή ισοπρενοειδή αποτελούν μια από τις πιο ποικιλόμορφες κατηγορίες μεταβολιτών. Το Dictionary of Natural Compounds (Buckingham 2004) αριθμεί περισσότερα από 30.000 τερπένια, τα οποία προέρχονται κυρίως από το φυτικό βασίλειο και σε αυτά περιλαμβάνονται βελτιωτικά γεύσης και αρώματα, αντιβιοτικά, ορμόνες φυτών και ζώων, μεμβρανικά λιπίδια, ουσίες που προσελκύουν έντομα, διαμεσολαβητές των βασικών διαδικασιών μεταφοράς ηλεκτρονίων, οι οποίες συνιστούν τα στάδια παραγωγής ενέργειας κατά την αναπνοή και φωτοσύνθεση. Ο ρόλος των τερπενίων στα φυτά θεωρείται ότι είναι διπλός, οικολογικός και φυσιολογικός. Πολλά από αυτά λειτουργούν ως αναστολείς της ανάπτυξης ανταγωνιστικών φυτών (αλληλοπάθεια). Άλλα είναι γνωστά ως εντομοκτόνα και άλλα προσελκύουν τους επικονιαστές. Το αμπσκισικό οξύ (abscissic acid) αποτελεί ένα από τα σεσκίτερπένια και λειτουργεί ως ορμόνη των φυτών. Το διτερπένιο, γιββερελικό οξύ (gibberellic acid), αποτελεί επίσης μια κύρια φυτική ορμόνη³⁹⁰. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο σκελετός των τερπενίων αποτελεί ένα από τα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά μιας πληθώρας βιοδραστικών φυσικών προϊόντων, όπως είναι η πλευρική αλυσίδα της φυτόλης στις χλωροφύλλες, ο διτερπενικός σκελετός σημαντικών αντικαρκινικών φαρμάκων (π.χ. ταξόλη) και η δομική μονάδα του σκελετού της τετραϋδροκανναβινόλης³⁹¹.

Παρόλο που οι τελικές χημικές δομές των τερπενίων διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους, όπως και οι δράσεις τους, εντούτοις όλα τα τερπένια προέρχονται από μια διαδοχική συνένωση μοριακών δομών, καθεμία από τις οποίες αποτελείται από ένα κομμάτι αλυσίδας με πέντε άτομα άνθρακα. Γενικά θεωρείται ότι τα τερπένια προέρχονται βιοσυνθετικά από το ισοπρένιο, εξ ου και η ονομασία ισοπρενοειδή. Σήμερα, είναι γνωστό ότι οι συγκεκριμένες μοριακές δομές που φέρουν πέντε άτομα άνθρακα αποτελούν *in vivo* τα μετατρέψιμα ισομερή πυροφωσφορικού ισοπεντενυλίου (isopentenyl pyrophosphate, IPP) και πυροφωσφορικού διμεθυλοαλλυλίου (dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP) (μονοπάτι του μεβαλονικού οξέος). Οι δύο μονάδες αυτές ενώνονται μεταξύ τους με ένα διαδοχικό τρόπο με τη βοήθεια ενζύμων που ονομάζονται πρενυλοτρανσφεράσες. Μεταξύ των προϊόντων που σχηματίζονται περιλαμβάνονται το γερανύλιο (geranyl), το φαρνεσύλιο (farnesyl) και το γερανυλογερανύλιο (geranyl geranyl), τα πυροφωσφορικά (pyrophosphates), το σκουαλένιο (squalene) και το φυτένιο (phytoene), τα οποία αποτελούν τους άμεσους προδρόμους των κύριων οικογενειών των τερπενίων. Επακόλουθες τροποποιήσεις στο σκελετό της ανθρακικής αλυσίδας (τυπικά μέσω ενζυμικά καταλυόμενης κυκλοποίησης, οξειδωσης και αναδιαμόρφωσης του σκελετού) οδηγούν στη δημιουργία πληθώρας δομών ισοπρενοειδών. Μπορούν να είναι άκυκλα ή κυκλικά. Αυτά διαφοροποιούνται ανάλογα με τον αριθμό ατόμων άνθρακα που έχουν στο μόριό τους. Έτσι, διακρίνονται σε ημιτερπένια (hemiterpenes, 5C), μονοτερπένια (monoterpenes, 10C), σεσκιτερπένια (sesquiterpenes, 15C), διτερπένια (diterpenes, 20C), σεστερτερπένια (sesterterpenes, 25C), τριτερπένια (triterpenes, 30C) και καροτενοειδή (carotenoids, 40C)³⁹¹.

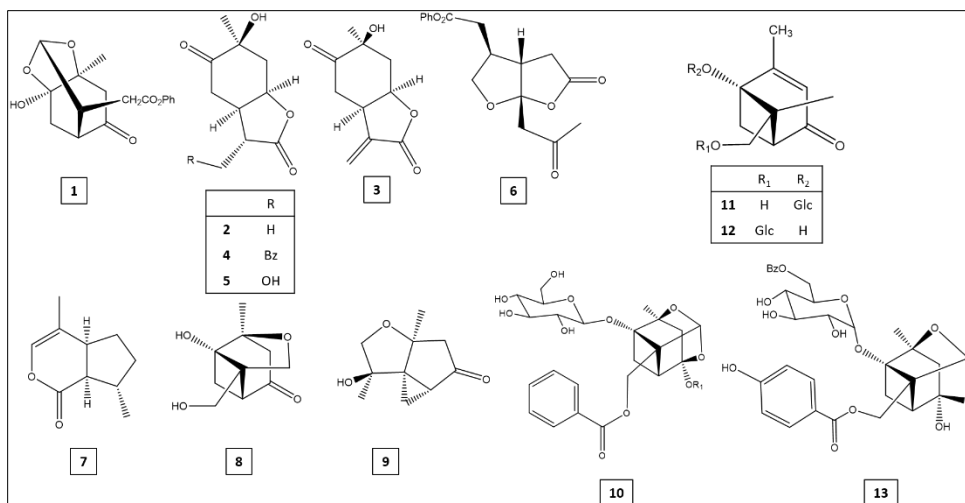
Τα μονοτερπένια αποτελούν μικρά, μη πολικά μόρια, τα οποία χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός κυκλοπεντανο-(c)-πυρανικού δακτυλίου στο μόριό τους. Είναι περισσότερο γνωστά ως συστατικά των αιθερίων ελαίων και των ρητινών που λειτουργούν ως άμυνα των αρωματικών φυτών. Οι βιολογικές δράσεις των μονοτερπενίων έχουν μελετηθεί εκτενώς και φαρμακολογικά αξιόλογες είναι η αντιαρθριτική, αναλγητική, αντιφλεγμονώδης³⁹², αντιαρρυθμική, κατευναστική, αντιϋπερτασική, αντιοξειδωτική, διουρητική, αντιμικροβιακή, αντιαλλεργική, αντισπασμωδική και κυτταροτοξική³⁹³.

Τα μονοτερπένια που φέρουν σκελετό *πάρα*-μενθανίου ή πινανίου, ο οποίος χαρακτηρίζεται ως "cage-like", είναι αντιπροσωπευτικά και κύρια βιοδραστικά συστατικά στη ρίζα των ειδών της παιώνιας, ενώ παρουσιάζουν ποικίλες φαρμακολογικές δράσεις όπως αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική, αντιπηκτική, ηρεμιστική, αναλγητική και αντι-αλλεργική³⁹⁴.

Μέχρι σήμερα περισσότερα από 60 μονοτερπενοειδή έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί από πολλά είδη του γένους. Θεωρείται ότι αυτού του τύπου μονοτερπένια σχηματίζονται αρχικά από κυκλοποίηση του φωσφορικού γερανυλίου, ακολουθούμενη από πολλά στάδια οξειδωσης, κυκλοποίησης, βενζυλίωσης, γλυκοζυλίωσης κ.ά. αν και τα πειραματικά δεδομένα γύρω από τα βιοσυνθετικά μονοπάτια είναι ελλιπή και οι βιογενετικές σχέσεις μεταξύ των ομάδων των μονοτερπενίων παραμένουν μερικώς ασαφείς.

Από τα είδη του γένους *Raeonia* έχουν συνολικά απομονωθεί 13 μονοτερπένια υπό τη μορφή γενινών. Ανάμεσα σε αυτά περιλαμβάνεται η παιωνιφλοριγενόνη (**1**), η οποία αποτελεί ένα από τα κυριότερα βιοδραστικά συστατικά του γένους και έχει βρεθεί στα περισσότερα είδη όπως *P. suffruticosa*, *P. albiflora*, *P. peregrina*, *P. lactiflora* και *P. parnassica*. Τα περισσότερα μονοτερπένια έχουν απομονωθεί από την *P. suffruticosa*. Τρία πάρα-μενθano μονοτερπένια, οι παιωνιλακτόνες A-C (**2, 3, 4**) έχουν απομονωθεί από την *P. albiflora*. Η 9-υδροξυπαιωνιλακτόνη A (**5**) και η παιωνιλίδη (raeonilide) (ασυνήθιστο ακυκλικό μονοτερπένιο) (**6**) έχουν βρεθεί στο είδος *P. delavayi*. Η νεπεταλακτόνη (nepetalactone) (**7**) η οποία απομονώθηκε από την *P. anomala* είναι ένα ιριδοειδές μονοτερπένιο. Η παιωνισουφρόνη (raeonisuffrone) (**8**), που απομονώθηκε από το φλοιό της *P. suffruticosa*, είναι ένα τρικυκλικό παράγωγο. Τέλος, η παιωνισοθουγιόνη (raeonisothujone) (**9**), το οποίο αποτελεί το πρώτο παράδειγμα μονοτερπενίου *όρθο*-μεθανικού τύπου, φέρει έναν δακτύλιο κυκλοπροπανίου³⁷⁸.

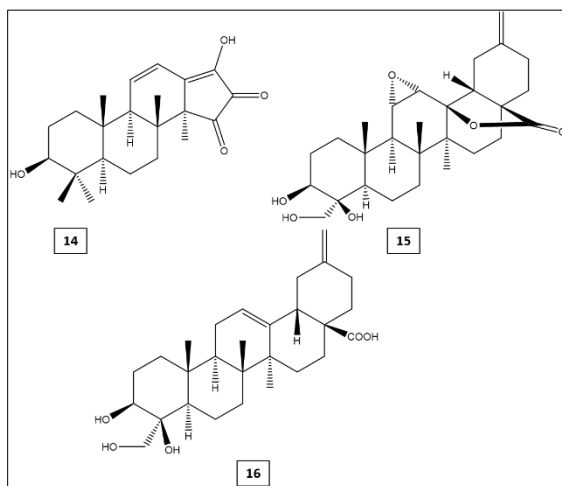
Επίσης 45 μονοτερπενικοί γλυκοσίδες έχουν απομονωθεί από είδη παιώνιας. Η παιωνιφλορίνη (**10**) είναι ο πιο σημαντικός δραστικός δευτερογενής μεταβολίτης του γένους. Αποτελεί το χαρακτηριστικό χημειοταξινομικό δείκτη του γένους *Raeonia*, καθώς απαντάται σε όλα τα είδη. Εντοπίζονται επίσης μονο- και διβενζοϊκά παράγωγα παιωνιφλορίνης με διαφορετικούς υποκαταστάτες στον αρωματικό δακτύλιο. Οι μονοτερπενικοί γλυκοσίδες mudanpioside F (**11**) και G (**12**) δε φέρουν ακυλοξυ- υποκαταστάτη. Η α -βενζυλοξυπαιωνιφλορίνη (**13**) αποτελεί ένα α -γλυκοσίδη μονοτερπενίου, ενώ απαντώνται και D-γαλακτοσίδες μονοτερπενίων³⁸⁹.



Εικόνα 164. Μονοτερπένια και Μονοτερπενικοί γλυκοσίδες που εντοπίζονται στο γένος *Paeonia*

Τριτερπένια και Στεροειδή

Συνολικά 4 στεροειδή, όπως η β-σιτιστερόλη και παράγωγα αυτής, αλλά και πάνω από 30 τριτερπένια έχουν απομονωθεί από διαφορετικά τμήματα ειδών παιώνιας, όπως είναι οι ρίζες, ο φλοιός της ρίζας, τα ριζώματα, τα φύλλα και τα άνθη. Ανάμεσα στα τριτερπένια, μόνο 2 ουσίες είναι τετρακυκλικά τερπενοειδή, ενώ τα υπόλοιπα είναι πεντακυκλικά³⁷⁸. Ενδεικτικά παρουσιάζονται τα παλβινόνη (palbinone) (**14**), παιωνενοΐδη Α (paeonenoide A) (**15**) και 3β,4β,23-τριϋδροξυ-24,30-δινορολεα-12,20(29)-διεν-28-οϊκό οξύ (3b,4b,23-trihydroxy-24,30-dinoroleana-12,20(29)-dien-28-oic acid) (**16**).

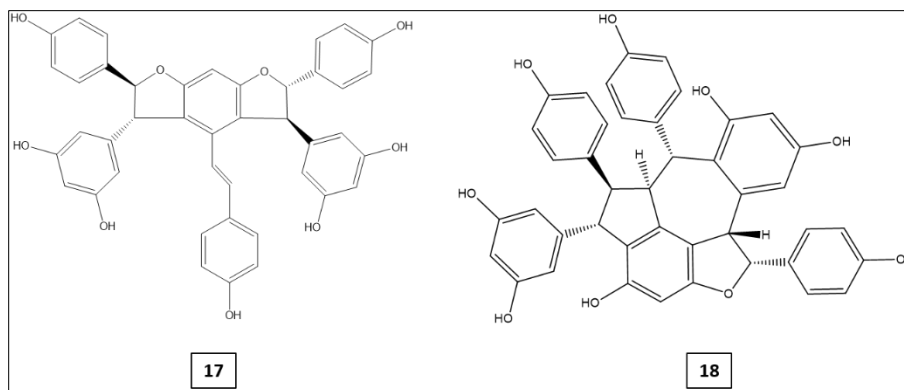


Εικόνα 165. Τριτερπένια που εντοπίζονται στο γένος *Paeonia*

Στιλβένια

Τα στιλβένια είναι μια μικρή ομάδα φαινυλοπροπανοειδών τα οποία χαρακτηρίζονται από έναν 1,2-διφαινυλοαιθυλένο- σκελετό. Τα περισσότερα στιλβένια φυτικής προέλευσης αποτελούν παράγωγα της βασικής μονάδας της *trans*-ρεσβερατρόλης (3,5,4'-τριϋδροξυ-*trans*-στιλβένιο), αν και άλλες δομές είναι δυνατόν να βρεθούν σε συγκεκριμένες οικογένειες φυτικών ειδών³⁹⁵. Κοινώς απαντώμενα φυτικά στιλβένια απομονώνονται από ποικίλες οικογένειες, όπως Vitaceae, Pinaceae, Fabaceae και Rosaceae. Βιοσυνθετικά προέρχονται από το μονοπάτι του σικιμικού οξέος και τη γενικότερη πορεία σύνθεσης των φαινυλοπροπανοειδών. Στους φυτικούς οργανισμούς ενισχύουν την άμυνα, προσφέρουν προστασία από την ακτινοβολία UV και συμβάλλουν στη βιοδιαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών. Τα τελευταία 15 χρόνια, τα στιλβένια φυτικής προέλευσης έχουν τραβήξει το επιστημονικό ενδιαφέρον, καθώς εμφανίζουν αξιοσημείωτες βιολογικές δράσεις και θεραπευτικές εφαρμογές. Η ρεσβερατρόλη αποτελεί ένα από τα πιο εκτενώς μελετημένα φυσικά προϊόντα, καθώς θεωρείται ότι αποτελεί το υπεύθυνο συστατικό για τα ευεργετικά οφέλη στην υγεία του ανθρώπου τα οποία προκύπτουν από τη μέτρια κατανάλωση κόκκινου κρασιού. Εκατοντάδες είναι πλέον οι έρευνες που υποστηρίζουν ότι η ρεσβερατρόλη μπορεί να αποτρέψει ή να καθυστερήσει την ανάπτυξη μιας μεγάλης ομάδας ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων των καρδιαγγειακών παθήσεων και του καρκίνου, καθώς επίσης και να επιμηκύνει το προσδόκιμο ζωής πολλών οργανισμών³⁹⁶.

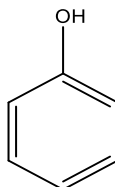
Για την οικογένεια Paeoniaceae τα στιλβένια αποτελούν μια διακριτή κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών και απαντώνται μόνο στα σπέρματα των ειδών. Δεν έχουν εντοπισθεί στα υπόλοιπα μέρη των φυτών. Συγκεκριμένα εννέα παράγωγα στιλβενίου απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν από τα σπέρματα των ειδών *P. suffruticosa* και *P. lactiflora*³⁷⁸. Δύο από τα στιλβένια που έχουν απομονωθεί είναι η γνετίνη H (gnetin H) (**17**) και η σουφρουτικοσόλη B (suffruticosol B) (**18**).



Εικόνα 166. Στιλβένια που εντοπίζονται στο γένος *Raeonia*

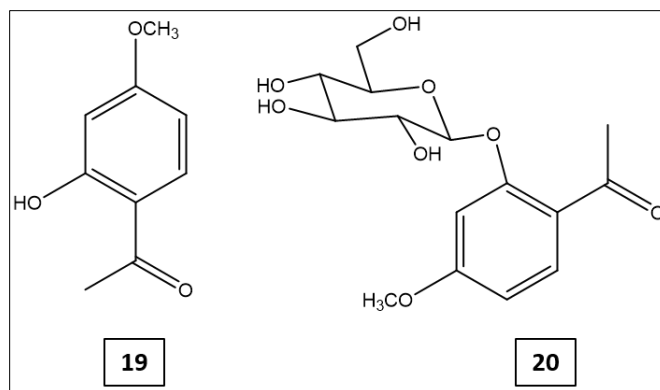
Φαινολικά παράγωγα

Τα φαινολικά παράγωγα αποτελούν μία ευρεία κατηγορία φυσικών προϊόντων με κοινό χαρακτηριστικό την ύπαρξη ενός βενζολικού δακτυλίου με ένα ή περισσότερα υδροξύλια στο μόριό τους (ελεύθερα ή υποκατεστημένα). Βιοσυνθετικά προέρχονται από την οδό του σικιμικού οξέος. Στους μεταβολίτες της κατηγορίας αυτής έχει αποδοθεί ένας μεγάλος αριθμός φαρμακολογικών ιδιοτήτων, όπως είναι η αντιοξειδωτική, η αντιμικροβιακή, η αντινεοπλασματική, η αντικρκιακή και η προστατευτική έναντι των καρδιαγγειακών παθήσεων.



Εικόνα 167. Φαινολικός δακτύλιος

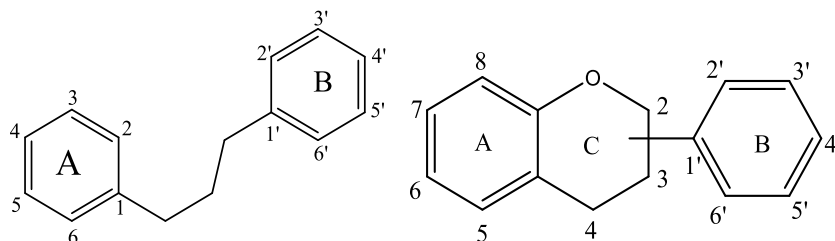
Τόσο οι φαινόλες όσο και τα ανάλογά τους εμφανίζονται ευρέως σε όλα τα μελετημένα είδη της οικογένειας *Raeoniaceae* και ο συνολικός αριθμός τους ξεπερνά τα 35 παράγωγα. Συνηθέστερα απαντώνται στις ρίζες ή στο φλοιό των ριζών των φυτικών ειδών. Κάποια από αυτά όπως η 2-φαινυλοαιθανόλη, το γαλλικό οξύ και το βενζοϊκό οξύ είναι τα συνηθέστερα απομονωθέντα μόρια. Επιπροσθέτως, η παιωνόλη (**19**) και τα παράγωγά της απαντώνται σε υψηλά ποσοστά στα ξυλώδη είδη *Moutan*, σε χαμηλά ποσοστά στις πόες *Raeonia*, ενώ δεν απομονώνονται από τα είδη του section *Ohaeria*. Συνολικά, 10 παιωνόλες έχουν απομονωθεί από το είδος *P. suffruticosa*. Αυτές είναι η παιωνόλη (raeonol), ο παιωνοσίδης (raeonoside) (**20**), η παιωνολίδη (raeonolide), οι σουφρουτικοσίδες A-E (suffruticoside A-E), ο απιοπαιωνοσίδης (ariopaeonoside) και η 3'-υδροξυπαιωνόλη (3'-hydroxyraeonol).



Εικόνα 168. Παιωνόλες που εντοπίζονται στο γένος *Raeonia*

Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι φαινολικά παράγωγα τα οποία αποτελούνται από 15 τουλάχιστον άτομα άνθρακα (2 βενζολικούς πυρήνες ενωμένους με μία αλυσίδα 3 ατόμων άνθρακα), με δομή που αναφέρεται ως C₆-C₃-C₆ (δομή βενζο-γ-πυρόνης). Θεωρούνται παράγωγα του φαινυλοπροπανίου και βιοσυντίθενται μέσω της οδού του σικιμικού οξέος³⁹⁷.

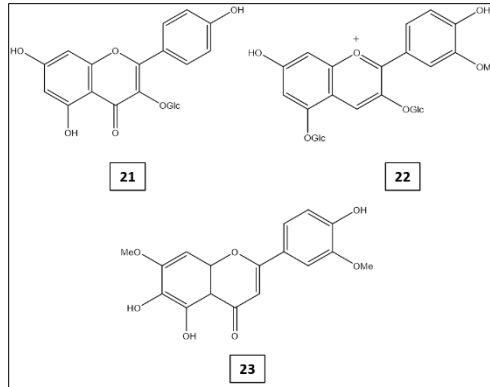


Εικόνα 169. Σύστημα C₆-C₃-C₆ και Βασικός σκελετός φλαβονοειδούς

Τα φλαβονοειδή έχουν επιδείξει ενδιαφέρουσες βιολογικές δράσεις όπως η αντιοξειδωτική, η ηπατοπροστατευτική, η αντιφλεγμονώδης, η κυτταροτοξική, η αντιμικροβιακή κ.ά. Αποτελούν υδροξυλιωμένα φαινολικά παράγωγα και όπως είναι γνωστό συντίθενται από τα φυτά ως απόκριση σε μικροβιακές μολύνσεις. Αποτελούν δευτερογενές σύστημα αντιοξειδωτικής άμυνας στους φυτικούς ιστούς, οι οποίοι εκτίθενται σε διάφορες μορφές αβιοτικού και βιοτικού στρες. Οι ουσίες αυτές εντοπίζονται στον πυρήνα των μεσόφυλλων κυττάρων των φυτών και μέσα στα κέντρα παραγωγής των ελευθέρων ριζών. Επίσης, ρυθμίζουν παράγοντες ανάπτυξης, όπως είναι η αυξίνη. Βιοσυνθετικά γονίδια έχουν εντοπισθεί σε διάφορα βακτήρια και μύκητες, τα οποία είναι υπεύθυνα για την ενισχυμένη παραγωγή φλαβονοειδών. Οι βιολογικές ιδιότητές τους επηρεάζονται από τη δομική κατηγορία στην οποία ανήκουν, το βαθμό της υδροξυλίωσης, τους υποκαταστάτες και τις συζεύξεις, και το βαθμό πολυμερισμού.

Το επιστημονικό ενδιαφέρον εστιάζεται στα πιθανά οφέλη για την υγεία του ανθρώπου, τα οποία προκύπτουν από την αντιοξειδωτική δράση των συγκεκριμένων πολυφαινολικών παραγώγων. Λειτουργικές ομάδες υδροξυλίου στα флаβονοειδή είναι υπεύθυνες για τις αντιοξειδωτικές δράσεις, καθώς εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες και/ή δημιουργούν χηλικά σύμπλοκα με μεταλλικά ιόντα, διαδικασία η οποία μπορεί να είναι κρίσιμη για την αποτροπή της δημιουργίας ελευθέρων ριζών οι οποίες καταστρέφουν τα βιομόρια-στόχους. Ως στοιχεία της διατροφής, τα флаβονοειδή θεωρούνται ότι εμφανίζουν ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία λόγω της ισχυρής αντιοξειδωτικής δράσης που επιδεικνύουν τόσο σε *in vivo* όσο και σε *in vitro* μελέτες. Έχουν την ικανότητα να επάγουν προστατευτικά ενζυμικά συστήματα στον άνθρωπο. Υπάρχει πλέον μεγάλος αριθμός μελετών στις οποίες αποδεικνύεται η προστατευτική δράση των флаβονοειδών έναντι πολλών μολύνσεων (βακτηριακής και ιικής προέλευσης παθήσεις) και εκφυλιστικών ασθενειών, όπως είναι οι καρδιαγγειακές παθήσεις, διάφοροι τύποι καρκίνου και άλλες σχετιζόμενες με το γήρας παθολογικές καταστάσεις³⁹⁷.

Συνολικά περισσότερα από 40 флаβονοειδή έχουν αναφερθεί στο γένος *Paeonia*. Μερικά από τα είδη στα οποία συναντώνται флаβονοειδή είναι τα *P. decora*, *P. trollioides*, *P. tenuifolia* και *P. suffruticosa*. Κυρίως απομονώνονται από τα άνθη των ειδών και διακρίνονται σε флаβονόλες, ανθοκυανιδίνες, χαλκόνες, флаβόνες, флаβανόνες και μια флаβαν-3-όλη. Έξι флаβονοειδή υπό τη μορφή γενινών έχουν ανιχνευθεί στο γένος και αυτά είναι η κερκετίνη, η καιμπφερόλη, η ισοραμνετίνη, η λουτεολίνη, η απιγενίνη και η χρυσοεριόλη. Τα γλυκοσυλιωμένα флаβονοειδή (μονο- και δι- σακχαρίτες) είναι τα υπεύθυνα βιοδραστικά συστατικά των υπέργειων τμημάτων και συγκεκριμένα των ανθέων της παιώνιας. Από το είδος *P. lactiflora* απομονώθηκε η αστραγαλίνη (astragalín) (**21**). Μία ανθοκυανιδίνη, η παιωνίνη (paeonín) (**22**), βρέθηκε στα άνθη του είδους *P. suffruticosa*. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν η C(6)-υποκατεστημένη флаβόνη, 5,6,4'-τριϋδροξυ-7,3'-διμεθοξυφλαβόνη (**23**), μερικές C(8)-υποκατεστημένες флаβονόλες και ένα χλωριωμένο παράγωγο πελαργονιδίνης^{378 389}.



Εικόνα 170. Φλαβονοειδή που εντοπίζονται στο γένος *Raemonia*

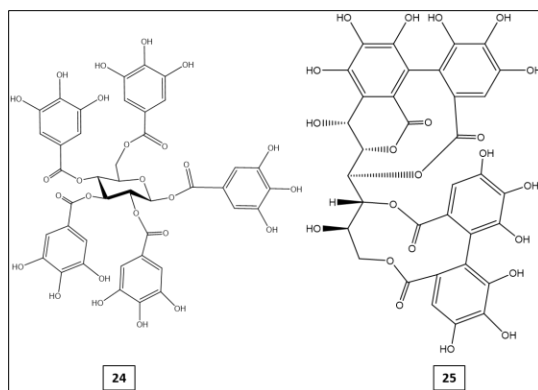
Ταννίνες

Ο όρος ταννίνες αρχικά χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει τα φυτικά συστατικά που φέρουν την ιδιότητα της δέψης, κατά την οποία δημιουργούνται σταθερά συσσωματώματα μεταξύ του ακατέργαστου δέρματος και του κολλαγόνου στη βυρσοδεψία. Πρόκειται για δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών οι οποίοι προκύπτουν βιοσυνθετικά από την οδό του σικιμικού οξέος, ανήκουν στα πολυφαινολικά παράγωγα και το μοριακό τους βάρος ποικίλει από 50 έως 20.000 Da³⁹⁸. Στο μεγαλύτερο ποσοστό τους είναι υδατοδιαλυτοί και μπορούν να δώσουν κοινές φαινολικές αντιδράσεις και να προκαλέσουν καθίζηση (κατακρήμνιση) αλκαλοειδών, ζελατίνης και άλλων πρωτεϊνών. Με βάση τη δομή τους χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: συμπυκνωμένες ταννίνες (ταννίνες κατεχίνης, προανθοκυανιδίνες), υδρολυόμενες ταννίνες και πιο πολύπλοκης δομής ταννίνες. Οι συμπυκνωμένες ταννίνες ή προανθοκυανιδίνες προέρχονται από τον πολυμερισμό φλαβαν-3-ολών όπως η κατεχίνη ή η επικατεχίνη που συνδέονται με δεσμούς C-C. Παρουσία ισχυρού οξέος αποπολυμερίζονται και μετατρέπονται σε ανθοκυανιδίνες³⁹⁹. Οι υδρολυόμενες ταννίνες προκύπτουν από τη δημιουργία εστερικού δεσμού μεταξύ μιας πολυόλης όπως είναι η γλυκόζη με το γαλλικό οξύ ή με το διμερές προϊόν του, το εξαϋδροξυδιφενικό οξύ. Ο σκελετός τους διαμορφώνεται με περαιτέρω προσθήκες μορίων γαλλικού οξέος. Συγκεκριμένα τα μόρια του γαλλικού οξέος είναι εστεροποιημένα από την κεντρική πολυόλη και οι γαλλοϋλο ομάδες μπορούν επιπλέον να εστεροποιηθούν ή να δημιουργήσουν οξειδωτικά διασταυρούμενους δεσμούς προς δημιουργία πιο πολύπλοκων δομών. Οι ελλαγιταννίνες και οι γαλλοταννίνες υδρολύονται με επίδραση οξέος, βάσης ή ενζύμου, οπότε παράγεται ελλαγικό και γαλλικό οξύ, αντίστοιχα. Οι γαλλοταννίνες, οι πολυγαλλοϋλο-εστέρες της γλυκόζης, είναι οι πιο απλές υδρολυόμενες ταννίνες. Η 1,2,3,4,6-πεντα-*O*-γαλλοϋλο-β-D-γλυκόζη (β-PGG) (**24**) είναι μια γαλλοταννίνη που αποτελεί το κεντρικό

συστατικό στην βιοσυνθετική πορεία των υδρολυόμενων ταννινών. Η β-PGG φέρει πέντε εστερικούς δεσμούς, οι οποίοι σχηματίζονται ανάμεσα στις καρβοξυλικές ομάδες των γαλλικών οξέων και τις αλειφατικές υδροξυλομάδες ενός μορίου γλυκόζης⁴⁰⁰.

Στα τραχεόφυτα οι ταννίνες συνήθως βρίσκονται στους ξυλώδεις ιστούς αν και είναι δυνατόν να υπάρχουν στα φύλλα, στα άνθη ή στα σπέρματα. Οι ιστοί του φυτού που είναι πλούσιοι σε ταννίνες έχουν μια έντονα πικρή γεύση και αποφεύγονται από τους περισσότερους οργανισμούς που τα χρησιμοποιούν ως τροφή. Συγκεκριμένα η σύνδεση των ταννινών με τις γλυκοπρωτεΐνες του σιέλου προκαλούν μια χαρακτηριστική στυπτική γεύση και συνεπώς απώθηση των φυτοφάγων οργανισμών. Επίσης, η αλληλεπίδραση των ταννινών με τα απαραίτητα για την πέψη ένζυμα προκαλεί δυσπεψία και απώθηση των φυτοφάγων ωστόσο ωριμάσουν οι καρποί. Περιεκτικότητα ταννινών στην τροφή των ζώων μεγαλύτερη από 5% μπορεί να είναι θανατηφόρα. Η παρουσία ταννινών σε σπόρους εμποδίζει τη κατανάλωσή τους από τα πτηνά και την άκαιρη φύτρωση, αλλά και την προσβολή από μικροοργανισμούς που προκαλούν αλλοιώσεις. Στον άνθρωπο οι ταννίνες και κυρίως οι υδρολυόμενες παρουσιάζουν αντιοξειδωτική, κυτταροτοξική, αντιμεταλλαξιογόνο και αντιμικροβιακή δράση. Έχουν την ικανότητα να λειτουργούν συνεργιστικά με τα κοινά αντιβιοτικά και να καταπολεμούν μικρόβια που αναπτύσσουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά. Επίσης παρεμποδίζουν τη μετάσταση καρκινικών όγκων⁴⁰¹.

Οι ταννίνες του γένους *Raeonia* απομονώνονται κυρίως από τους καρπούς (κάποιες από το φλοιό της ρίζας), συνήθως ανήκουν στην κατηγορία των υδρολυόμενων ταννινών και στο σύνολό τους είναι περισσότερες από 30. Έχουν παραληφθεί από διάφορα είδη του γένους, όπως *P. suffruticosa*, *P. obovata*, *P. albiflora* και *P. lactiflora*. Πέρα από την ουσία PGG και τα παράγωγά της, απαντώνται ακόμη γαλλοταννίνες που δε φέρουν μονάδες γλυκόζης αλλά είναι παράγωγα γαλλοϋλοσουκρόζης, αλλά και ελλαγιταννίνες, ανάμεσα στις οποίες υπάρχουν παράγωγα όπου ο δακτύλιος πυρανόζης της γλυκόζης βρίσκεται σε ανοιχτή μορφή όπως στην ουσία κασουαρίνη (casuariin) (25). Επίσης έχουν απομονωθεί προανθοκυανιδίνες.^{402 403 378 389}



Εικόνα 171. Ταννίνες που εντοπίζονται στο γένος *Paeonia*

Τέλος, υπάρχουν δευτερογενείς μεταβολίτες ποικίλων χημικών κατηγοριών που έχουν απομονωθεί από την οικογένεια *Paeoniaceae*. Σε αυτούς ανήκουν αλκυλο υδρογονάνθρακες, λιπαρά οξέα, λιπαρές αλκοόλες, L-αμινοξέα, νουκλεοτίδια, κουμαρίνες, ανθρακινόνες, σάκχαρα, η αμυγδαλίνη (amygdalin), το βενζαμίδιο (benzamide) και η (Z)-εξ-3-εναλη ((Z)-hex-3-enal)³⁷⁸.

14.2.5 Δρογοφαρμακολογία

Παραδοσιακές Χρήσεις - Εθνοφαρμακολογικές Μελέτες

Το γένος *Paeonia* είναι αρκετά δημοφιλές και μελετημένο φαρμακολογικά στην κινεζική παραδοσιακή θεραπευτική και από αυτήν προέρχονται οι περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την παραδοσιακή χρήση των φυτικών ειδών της οικογένειας. Συγκεκριμένα οι ρίζες των ειδών *P. suffruticosa*, *P. lactiflora* και *P. obovata* είναι οι πιο σημαντικές δρόγες της παραδοσιακής κινεζικής θεραπευτικής και τα εκχυλίσματά τους έχουν χρησιμοποιηθεί ως αναλγητικά, ηρεμιστικά, αντιμικροβιακά και αντιφλεγμονώδη. Υπάρχουν ακόμη συνταγές που περιλαμβάνουν τις παραπάνω ρίζες για την αντιμετώπιση παθολογικών καταστάσεων όπως είναι τα καρδιαγγειακά νοσήματα, η εξαγγείωση αίματος, το λιμνάζον αίμα, ηπατικές διαταραχές και ποικίλες γυναικολογικές παθήσεις³⁸⁹. Τα είδη αυτά έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την καταπολέμηση των μυϊκών κραμπών, ως αντισπασμωδικά, για την αντιμετώπιση της ζάλης και κυκλοφορικών προβλημάτων. Το γένος έχει αξιοποιηθεί για την αντιμετώπιση λίθων της ουροδόχου κύστεως, του ίκτερου, του στομαχικού άλγους, των γαστρεντερικών διαταραχών, της διάρροιας και των ωδίνων του τοκετού. Λαϊκοί θεραπευτές συνιστούσαν την παιώνια σε ασθενείς που ταλαιπωρούνταν από εφιάλτες, επιληψία και ψυχικές διαταραχές, όπως είναι η παράνοια. Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες δρόγες ήταν οι ρίζες και τα σπέρματα. Ήδη από την εποχή του Ιπποκράτη ήταν αρκετά διαδεδομένη η ευεργετική επίδραση της παιώνιας στην

επιληψία. Στο σύστημα ιατρικής 'Unani', το είδος *Paeonia officinalis* χρησιμοποιείται ως συστατικό αντισπασμωδικών, αντιφλεγμονωδών, καρδιοτονωτικών, μαλακτικών, νευροπροστατευτικών, αντιεπιληπτικών σκευασμάτων και για την αντιμετώπιση της παράλυσης, της παιδικής επιληψίας, της χορείας, της υστερίας, της εγκεφαλικής ατονίας και της νευρικής αδυναμίας. Αρκετά δημοφιλής είναι η ίδια δρόγη και στην αγιουβερδική ιατρική, όπου λαμβάνεται σε περιπτώσεις ίκτερου, υδρωπικίας, ηπατίτιδας, ηπατομεγαλίας, μητρίτιδας, σπληνομεγαλίας, ηπατικής δυσλειτουργίας και δυσλειτουργίας της σπλήνας, ανορεξίας, κίρρωσης, καχεξίας⁴⁰⁴. Στην παραδοσιακή ιατρική της Μογγολίας το είδος *P. anomala* αποτελεί ένα δημοφιλές για τις εθνοφαρμακολογικές του ιδιότητες βότανο, το οποίο χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση της δυσπεψίας, του κοιλιακού άλγους, των διαταραχών του παγκρέατος, των φλεγμονών και των γυναικολογικών παθήσεων. Επίσης, εκχύλισμα της *P. anomala*, με υπεύθυνο δραστικό συστατικό τη γνετίνη Η (παράγωγο ρεσβερατρόλης), έχει βρεθεί σε *in vitro* μελέτες ότι επιφέρει αξιοσημείωτα αποτελέσματα σε περιπτώσεις αντιδράσεων υπερευαισθησίας⁴⁰⁵.

Όπως αναφέρθηκε το είδος *P. lactiflora*, γνωστό και ως κινεζική παιώνια, αποτελεί ένα δημοφιλές παραδοσιακό κινέζικο βότανο. Πιο συγκεκριμένα το αφέψημα των αποξηραμένων ριζών του είδους (χωρίς το φλοιό) έχει χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας για αιώνες, ενώ πήρε έγκριση κυκλοφορίας στις αγορές της Κίνας, Κορέας και Ιαπωνίας ως μη-βιολογικό αντιρρευματικό φάρμακο (nonbiologic DMARD) από τον Εθνικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων της Κίνας (State Food and Drug Administration of China) το 1998. Τα 6-15 g έχουν οριστεί ως μέγιστη ημερήσια *per os* δόση της ακατέργαστης δρόγης που περιέχει συγκεκριμένο ποσοστό παιωνιφλορίνης⁴⁰⁶. Το υδατικό ή αιθανολικό εκχύλισμα της ρίζας, γνωστό και ως συνολικοί γλυκοσίδες της παιώνιας (total glucosides of paeony, TGP), με περισσότερα από 15 συστατικά, φέρει ως κύριο δραστικό μεταβολίτη την παιωνιφλορίνη. Σύγχρονες μελέτες απέδειξαν την αντιφλεγμονώδη, ηπατοπροστατευτική και αναλγητική επίδραση του TGP, τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* μελέτες, με πιθανούς μηχανισμούς δράσης την αναστολή της παραγωγής των φλεγμονωδών μεσολαβητών, την παρεμπόδιση της υπερέκφρασης των αποκρίσεων του ανοσοποιητικού συστήματος, μέσω της διατήρησης της ισορροπίας της λειτουργίας των βοηθητικών Τ κυττάρων (Th) και των Τ παρεμποδιστών (Ts), αλλά και την αναστολή του οξειδωτικού στρες και της υπέρβασης των επιπέδων Ca^{2+} ⁴⁰⁷. Άλλες παραδοσιακές χρήσεις της ρίζας, οι οποίες όμως δεν πλαισιώνονται από φαρμακολογικές μελέτες, είναι η αντιμετώπιση του ατοπικού εκζέματος, των δοθιήνων, των πληγών και των εγκαυμάτων, του πυρετού και της στειρότητας.

Εθνοφαρμακολογική μελέτη απέδειξε ότι τα αιθέρια έλαια των ριζών δύο ελληνικών ενδημικών ειδών, της *P. parnassica* και της *P. clusii* ssp. *clusii*, και ενός υποείδους, της *P. mascula* ssp. *hellenica* διαθέτουν αξιοσημείωτες αντιμικροβιακές δράσεις, έναντι Gram (+) και Gram (-) βακτηρίων, αλλά και αντικές ιδιότητες λόγω της παρουσίας συστατικών όπως η σαλικυλαλδεΰδη και η παιωνόλη. Το γεγονός αυτό είναι σύμφωνο με τη μακρόχρονη, ήδη από την αρχαιότητα, παραδοσιακή χρήση της παιώνιας ως αντισηπτικό και καθαριστικό των πληγών³⁸⁷.

Δύο είδη εκχυλισμάτων ρίζας παιώνιας, το RPA (*Radix Paeoniae Alba*) από τη ρίζα λευκής παιώνιας (WPR) και το RPR (*Radix Paeoniae Rubra*) από τη ρίζα κόκκινης παιώνιας (RPR), χρησιμοποιούνται στην κινεζική παραδοσιακή θεραπευτική εδώ και πολλά χρόνια με πηγές τα είδη *P. lactiflora* και *P. veitchii*, τα οποία έχουν ρίζες διαφορετικού χρώματος και μικρές διαφοροποιήσεις στο ότι η WPR περιέχει υψηλό ποσοστό παιωνιφλορίνης και παιωνόλης και χαμηλότερο ποσοστό αλμπιφλορίνης σε σχέση με την RPR⁴⁰⁸. Τα εκχυλίσματα των ριζών της *P. lactiflora* είναι ευρέως γνωστά ως RPAE (*Radix Paeoniae Alba Extracts*) και περιέχουν περίπου 40 κύρια συστατικά, τα οποία εκδηλώνουν ποικίλες φαρμακολογικές ιδιότητες όπως η αντιγηραντική δράση, ο έλεγχος της φλεγμονής, η αντιαλλεργική δράση, η αντιμετώπιση των θρομβώσεων, η ενίσχυση της μνήμης, η αντιυπεργλυκαιμική δράση, η προστασία του παγκρέατος κ.ά. Η παιωνιφλορίνη αποτελεί ένα από τα δραστικά συστατικά των RPAE για την αντιμετώπιση της επιληψίας, της εγκεφαλικής ισχαιμίας και της νόσου AD, όπου εμφανίζει δράση στον ιππόκαμπο, το τμήμα του εγκεφάλου που είναι υπεύθυνο για την προσωρινή μνήμη και την αποθήκευση νέων πληροφοριών. Η συνεχής απόθεση πλακών β-αμυλοειδούς πρωτεΐνης (Αβ) στον εγκέφαλο AD ασθενών θα μπορούσε να αντιμετωπιστεί με τη διακοπή σχηματισμού νέων Αβ ινιδίων και αποσταθεροποίηση των ήδη σχηματισμένων ινιδίων με τη χρήση PGG που παραλαμβάνεται από πολλά είδη παιώνιας όπως είναι η *P. suffruticosa*⁴⁰⁹. Το εκχύλισμα της ρίζας του είδους *P. lactiflora*, το οποίο περιέχει επίσης παιωνόλη, παιωνιφλορίνη και αλμπιφλορίνη, έχει επιδείξει ανασταλτική δράση επί του ενζύμου μονοαμινοξειδάση, το οποίο είναι υπεύθυνο για την εκδήλωση χρόνιας ελαφριάς μορφής αγχώδους διαταραχής και έχει χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά στην κινεζική ιατρική ως αντικαταθλιπτικό⁴¹⁰. Τα εκχυλίσματα της ρίζας του είδους *P. lactiflora* περιέχουν παιωνόλη, βενζοϊκό οξύ, γαλλικό μεθυλεστέρα και PGG και εμφανίζουν βακτηριοκτόνο δράση σε στελέχη όπως το *Helicobacter pylori*, το οποίο παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε κοινά αντιβιοτικά όπως η αμοξικιλίνη, η κλαριθρομυκίνη κ.ά.⁴¹¹. Τρεις μονοτερπενικοί γλυκοσίδες (β-γενιτοβιοσυλοπαιωνοφλορίνη, η πυριδυλοπαιωνιφλορίνη και ο

(8R)-πιπεριτον-4εν-9-Ο-β-D-γλυκοκυρανοσίδης) μαζί με άλλα οκτώ συστατικά (6'-Ο-β-γλυκοκυρανοσουλολαμπιφλορίνη, παιωνιφλορίνη, διβενζοϋλοαμπιφλορίνη, αμπιφλορίνη, οξυπαιωνιφλορίνη, 8-διβενζοϋλοπαιωνιφλορίνη, 8-διβενζοϋλοπαιωνιδανίνη και 1-Ο-β-D-γλυκοκυρανοσουλολο-παιωνισουφρόνη), τα οποία παραλήφθηκαν από τα σπέρματα του είδους *P. suffruticosa*, έχουν αποδειχθεί κλινικώς αποτελεσματικοί δευτερογενείς μεταβολίτες για τον περιορισμό της αλλοίωσης του DNA και τον κυτταρικό θάνατο που επάγεται από την έκθεση σε γ ακτινοβολία⁴¹². Η παιωνιφλορίνη παρουσιάζει εξαιρετικά αποτελέσματα στις περιπτώσεις αλλεργικής φλεγμονώδους απόκρισης και η παιωνόνη προκαλεί αναστολή του οιδήματος του ιστού στην αρθρίτιδα⁴¹³. Η παιωνόλη που απομονώθηκε ως κύριο φαινολικό συστατικό από το είδος *P. suffruticosa* εμφάνισε ποικίλες δράσεις, όπως η ηπατοπροστατευτική έναντι νεοπλασιών, η αντιοξειδωτική, η βελτίωση των αποκρίσεων του ανοσοποιητικού συστήματος και η μείωση των επιπέδων της γλυκόζης του αίματος⁴¹⁴. Μείγμα παιωνιφλορίνης και γαλλικού οξέος, δύο παραγώγων του πολικού εκχυλίσματος του είδους *P. rockii*, έχει δειχθεί ότι φέρει αντιμυκητιασικές ιδιότητες έναντι του στελέχους *Candida albicans*, το οποίο είναι υπεύθυνο για μολύνσεις στη στοματική κοιλότητα και στα γεννητικά όργανα⁴¹⁵. Επίσης το φλαβονοειδές ταξιφολίνη, το οποίο έχει παραληφθεί από το γένος *Raeonia*, αποτελεί ένα σημαντικό φυσικό προϊόν για τη βιομηχανία των τροφίμων, των καλλυντικών και των φαρμάκων, καθώς έχει επιδείξει αξιοσημείωτες δράσεις σε καρδιαγγειακά νοσήματα, στην αποτροπή εκδήλωσης καρκίνου των ωθηκών και στη διακοπή της ανάπτυξης του καρκίνου του μαστού⁴¹⁶. Τέσσερις χειρόμορφες πολυφαινόλες (σουφρουτικοσόλη Α, σουφρουτικοσόλη Β (suffruticosols), *trans*-ε-βινιφερίνη και *trans*-γνετίνη Η) που απομονώθηκαν από τα σπέρματα της *P. lactiflora*, φάνηκε ότι αναστέλλουν ικανοποιητικά το βακτηριακό ένζυμο νευραμινιδάση, το οποίο έχει ενοχοποιηθεί για την πρόκληση βακτηριακών μολύνσεων⁴¹⁷.

Σύγχρονες φαρμακολογικές μελέτες

- Αντιοξειδωτική δράση

Οι ουσίες γαλλοϋλοπαιωνιφλορίνη, γαλλοϋλοξυπαιωνιφλορίνη και σουφρουτικοσίδες (suffruticosides) Α-D επέδειξαν ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε δοκιμασία εξουδετέρωσης της ελεύθερης ρίζας DPPH συγκριτικά με την α-τοκοφερόλη και την οξυπαιωνιφλορίνη, η οποία παρουσίασε μέτρια δράση. Η υδατοδιαλυτότητα των παραπάνω δραστικών γλυκοσιδών επισημαίνεται για τη χρησιμότητά τους ως φυσικοί αντιοξειδωτικοί

παράγοντες. Έχει τονιστεί η σημασία ύπαρξης του γαλλούλο- υποκαταστάση στα παράγωγα παιωνόλης, προκειμένου να εμφανίζεται ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, καθώς σε όσα μόρια απουσιάζει ο συγκεκριμένος υποκαταστάτης δεν παρουσιάζεται καμία δραστικότητα³⁸⁹. Η ουσία παιωνίνη C (ραεονίνη C), η οποία αποτελεί έναν μονοτερπενικό γαλακτοσίδη που απομονώθηκε από τους καρπούς του είδους *P. emodi*, εμφάνισε ικανότητα εξουδετέρωσης της ελεύθερης ρίζας ABTS. Το εκχύλισμα του φλοιού της ρίζας *P. suffruticosa* μπορεί να καταστείλει το σπάσιμο του pUC18 DNA που επάγεται από τη φαινυλοϋδροκινόνη (PHQ) και να εξουδετερώσει τις ελεύθερες ρίζες υπεροξειδίου και υδροξυλίου. Επίσης η ουσία PGG είναι ένας από τους πιο ισχυρούς αντιοξειδωτικούς παράγοντες. Αιθανολικά εκχυλίσματα ρίζας παιωνίας, τα οποία περιέχουν γαλλικό οξύ και γαλλικό μεθυλεστέρα, φέρουν αντιμεταλλαξιογόνες ιδιότητες. Εκχυλίσματα του είδους *P. lactiflora* αποτελούν πηγή αντιοξειδωτικών ουσιών (γαλλικό οξύ και γαλλικίνη (galligin)) οι οποίες αναστέλουν τη δημιουργία ελεύθερης ρίζας DPPH και τη λιπιδική υπεροξειδωση, ενώ θεωρούνται κατάλληλες για την αντιμετώπιση νευρικών διαταραχών επαγόμενων από το οξειδωτικό στρες³⁷⁸.

- Αντιογκογόνος δράση

Υδατικό εκχύλισμα ρίζας παιωνίας εμφάνισε ανασταλτική δράση σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές ήπατος HepG2 και Hep3B. Το συστατικό PGG, το οποίο απομονώνεται από πολλά είδη του γένους *Raeonia*, επέδειξε *in vitro* αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης ανθρώπινου ηπατοκυτταρικού καρκινώματος SK-HEP-1. Επίσης, η παιωνόλη επέδειξε σαφή ανασταλτική δράση επί της ανάπτυξης ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων της σειράς HepG2. Συγχρόνως, έδειξε ότι ενισχύει τη δράση των χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Η ρεσβερατρόλη, καθώς επίσης και τα διμερή και τριμερή παράγωγά της που απομονώθηκαν από τα σπέρματα της *P. lactiflora*, κατέστειλαν ισχυρώς τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HL-60 (ανθρώπινη προμυελοκυτταρική λευχαιμία) και προκάλεσαν επαγωγή της αλλοίωσης του DNA αυτών. Η αναστολή του γονιδίου 1B1 του κυτοχρώματος P450 φάνηκε να σχετίζεται με την αποπτωτική δράση της ρεσβερατρόλης³⁷⁸.

- Δράση κατά των παθογόνων μικροοργανισμών

Το μεθανολικό εκχύλισμα των φύλλων της *P. suffruticosa* επέδειξε ισχυρή ανασταλτική δράση στο ένζυμο HIV-1 ιντεγκράση (HIV-1 integrase) και στον ιό του έρπητα (*Herpes simplex*).

Θερμό υδατικό εκχύλισμα της ρίζας *P. lactiflora* ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των μυκήτων *Trichophyton mentagrophytes* IFO 6202 και *T. rubrum* IFO 5467. Το βενζοϊκό οξύ και τα μονοτερπενοειδή συστατικά της ρίζας, αποτελούν πιθανούς ακαρεοκτόνους παράγοντες και μόρια οδηγούς για την ανάπτυξη προϊόντων ελέγχου του *Tyrophagus putrescentiae*. Το κλάσμα οξικού αιθυλεστέρα που παραλήφθηκε από τη ρίζα της *P. lactiflora* έδειξε δράση κατά του ιού της ηπατίτιδας Β, ενώ το δραστικό συστατικό φάνηκε να είναι η ουσία PGG. Υδατικά εκχυλίσματα του είδους *P. veitchii* είναι δραστικά κατά των εντεροϊών Coxsackie B3, Coxsackie B5, Polio I, Echo 9, Echo 29. Τέλος, το αιθέριο έλαιο που παραλήφθηκε από το είδος *P. mascula*, επέδειξε μέτρια δραστικότητα κατά των στελεχών *Yersinia pseudotuberculosis* και *Bacillus cereus*³⁷⁸.

- Ανοσορρυθμιστική και Αντιφλεγμονώδης Δράση

Το ολικό κλάσμα των τερπενικών γλυκοσιδών της ρίζας του είδους *Paeonia lactiflora* (TGP) φάνηκε να επιδρά στη φλεγμονή σε αυτοάνοσα νοσήματα, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα και ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος. Μάλιστα, όταν συνδυάστηκε με μεθοτρεξάτη (MTX) προέκυψαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα για την αντιμετώπιση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, με ταχύτερη ανταπόκριση, και λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες. Φαίνεται πως το TGP ασκεί τη θεραπευτική του δράση επί της άρθρωσης, βελτιώνοντας την έκκριση και το μεταβολισμό των ινοβλαστών (FLS, υμενοκύτταρα τύπου Β), όπως αποδείχθηκε σε *in vivo* πείραμα. Η παιωνιφλορίνη αποτελεί ένα από τα δραστικά συστατικά, καθώς ελέγχει το μη ομαλό πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και την παραγωγή ιντερλευκινών 1 και 6 (IL-1, IL-6) και προσταγλανδίνης-2 (PGE2). Επίσης, ο γαλλικός μεθυλεστέρας επέδειξε αναστολή τόσο της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2) όσο και της 5-λιποξυγενάσης (5-LOX). Η παιωνόλη φέρει αντιαναφυλακτικές ιδιότητες ρυθμίζοντας τα επίπεδα ισταμίνης και TNF-α. Συγκεκριμένα, η ουσία PGG, η (-) γαλλική επιγαλλοκατεχίνη, η γαλλοακετοφαινόνη, αλλά όχι το γαλλικό οξύ, ανέστειλαν την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου που επάγεται από λιποπολυσακχαρίτες στα μακροφάγα. Τέλος, έχει δειχθεί ότι εκχυλίσματα παιώνιας μπορούν να αποτελέσουν χρήσιμους θεραπευτικούς παράγοντες για την αντιμετώπιση της ατοπικής δερματίτιδας και άλλων αλλεργικών αντιδράσεων²⁹⁰. Η ουσία παλβινόνη, η οποία ανήκει στην κατηγορία των τερπενοειδών και απομονώθηκε από το είδος *P. albiflora*, παρουσίασε ισχυρή ανασταλτική δράση στη μειωμένη σύνθεση του νικοτιναμιδο-αδενινο-φωσφορικού δινουκλεοτιδίου (NADPH) που συνδέεται με την 3α-υδροξυστεροειδική δεϋδρογενάση (3α-HSD) σε κυττόςλιο ήπατος

επίμυος. Η δράση της παλβινόνης ήταν ισχυρότερη από αυτή της πρότυπης αντιφλεγμονώδους ουσίας, ινδομεθακίνης³⁷⁸.

- Καρδιοπροστατευτική δράση

Εκχύλισμα που προήλθαν από διαφορετικά μέρη της *P. anomala* (φλοιός και ξύλο) εμφάνισαν αντιπηκτική δράση. Ομοίως, το υδατικό εκχύλισμα από το φλοιό της *P. suffruticosa* ανέστειλε τη συνάθροιση αιμοπεταλίων και το σχηματισμό θρομβοξάνης B2 κατόπιν χορήγησης από το στόμα. Το παιωνιλίδιο (ραεονιλίδη), το οποίο απομονώθηκε από το είδος *P. delavayi*, ανέστειλε εκλεκτικά τη συσσωμάτωση αιμοπεταλίων που προκαλείται από τον παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF) με $IC_{50}=8 \mu\text{g/mL}$ χωρίς να έχει επίδραση σε οποιοδήποτε άλλο μηχανισμό πήξης. Ένα παράγωγο πενταγαλλικής γλυκόζης, το οποίο απομονώθηκε από το παραπάνω εκχύλισμα, αποτέλεσε ισχυρό αναστολέα του ενζύμου βιοσύνθεσης της χοληστερόλης και της σκουαλεϊνικής συνθάσης επίμυος σε *in vitro* πείραμα. Επίσης, δραστικοί μεταβολίτες φαίνεται να είναι το γαλλικό οξύ και οι εστέρες αυτού. Η παιωνιφλορίνη έχει δειχθεί ότι μειώνει τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης, LDL-χοληστερίνης (λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας) και τριγλυκεριδίων. Εκχύλισμα ριζών του είδους *P. lactiflora* επέδειξε αγγειοδιασταλτική δράση σε απομονωμένη αορτή επίμυος, ενώ ως υπεύθυνο δραστικό συστατικό αναγνωρίστηκε μια γαλλοταννίνη. Οι γλυκοσίδες του πιναίου και οι γαλλούλογλυκοσίδες ενδέχεται να φέρουν επίσης αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες, οι οποίες προέρχονται από την αυξημένη απελευθέρωση νιτρικού οξειδίου από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η παιωνιφλορίνη και η παιωνόλη ελάττωσαν την καταστροφή του μυοκαρδίου σε επίμυες αναστέλλοντας την απόπτωση των καρδιακών κυττάρων. Εκχύλισμα φλοιού *P. suffruticosa* εμφάνισε αξιοσημείωτη καρδιοπροστατευτική δράση κατά της μυοκαρδιακής ισχαιμίας. Το ολικό κλάσμα τερπενικών γλυκοσιδών (TGP) αποδείχθηκε ότι έχει προστατευτική δράση κατά της βλάβης του μυοκαρδίου που προκαλείται από την ισοπρεναλίνη με δοσοεξαρτώμενο τρόπο³⁷⁸.

- Δράση στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (Κ.Ν.Σ.)

Η παιωνιφλορίνη επέδειξε αναλγητική δράση σε σπλαχνική υπεραλγησία σε επίμυες. Πιθανόν η δράση αυτή εκδηλώνεται μέσω των κ-οπιοειδών και $\alpha 2$ -αδρενεργικών υποδοχέων του Κ.Ν.Σ. Μελέτες έχουν δείξει ότι η παιωνιφλορίνη μπορεί να προκαλεί αναλγησία σε διάφορους

‘φαινότυπους’ υπερευαίσθησίας και αλγαισθησίας. Εκχύλισμα του είδους *P. lactiflora* μείωσε την προκαλούμενη από ρεσερπίνη κατάθλιψη. Αντικαταθλιπτική δράση εμφάνισε και το ολικό κλάσμα τερπενικών γλυκοσιδών (TGP). Το μεθανολικό εκχύλισμα φύλλων της *P. peregrina* εμφάνισε ελαφριά αντιχολινεργική και αντι-σεροτονινεργική δράση. Το ακατέργαστο εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων της *P. emodi* επέδειξε αξιοσημείωτη σπασμολυτική δράση με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Εκχυλίσματα ριζών τριών ελληνικών ειδών παιώνιας (*P. parnassica*, *P. mascula* ssp. *hellenica*, *P. clusii* ssp. *clusii*) επέδειξαν αντιεπιληπτική δράση. Πιθανόν, η αλμπιφλορίνη και η γαλλοταννίνη είναι υπεύθυνες για την αντιεπιληπτική δράση, ενώ η παιωνόλη έδειξε αγχολυτική δράση σε μύες. Επίσης, η παιωνιφλορίνη ελάττωσε τον όγκο εμφράκτου, καθώς επίσης βελτίωσε τα γνωστικά ελλείμματα που αποτελούν νευρολογικά συμπτώματα και προκαλούνται από προσωρινή απόφραξη μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας. Ομοίως, η παιωνόλη παρεμπόδισε το εγκεφαλικό έμφρακτο επεισόδιο σε επίμυες. Η παιωνιφλορίνη επίσης μείωσε τη νοητική ανεπάρκεια και την εγκεφαλική βλάβη που προκαλείται από κακή χρόνια εγκεφαλική ροή αίματος. Η θεραπευτική ισχύς του συγκεκριμένου μεταβολίτη στη θεραπεία της γεροντικής άνοιας και της νοητικής δυσλειτουργίας που προκαλείται από το γήρας έχει αναλυθεί σε μελέτη του 1994⁴¹⁹. Επίσης, οι ουσίες οξυπαιωνιφλορίνη και βενζοϋλοπαιωνιφλορίνη βελτίωσαν τη νοητική λειτουργία. Η παιωνιφλορίνη, τέλος, ελάττωσε την τοξικότητα που προκαλείται από την 1-μεθυλο-4-φαινυλο-1,2,3,6-τετραϋδροπυριδίνη (MPTP), παρέχοντας τη δυνατότητα ανάπτυξης ενός μη ντοπαμινεργικού ελέγχου της νευροεκφυλιστικής ασθένειας Parkinson³⁷⁸.

- Άλλες δράσεις

Το ολικό κλάσμα τερπενικών γλυκοσιδών (TGP) της ρίζας του είδους *Paeonia lactiflora* βελτίωσε τις μεταβολές στη δομή του ήπατος που προκαλούνται από την ανθρώπινη αλβουμίνη. Σε άλλη μελέτη έχει δειχθεί η ικανότητα περιορισμού ηπατοτοξικότητας από τις συγκεκριμένες ουσίες. Το εκχύλισμα ριζών της *P. lactiflora* θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως συμπλήρωμα διατροφής για τον έλεγχο της μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας. Το αιθανολικό εκχύλισμα ρίζας παιώνιας έχει δείξει *in vitro* αντιδιαβητική δράση. Η παιωνόλη ανέστειλε την οστεοκλαστογένεση σε κυτταρική σειρά όπου δοκιμάστηκε. Η 6'-O-β-D-γλυκοκυρανοσυλοαλμπιφλορίνη, η οποία απομονώθηκε από το μεθανολικό εκχύλισμα ριζών του είδους *P. lactiflora*, επέδειξε άμεση διεγερτική δράση στο σχηματισμό οστών *in vitro*³⁷⁸. Δευτερογενής μεταβολίτης που ανήκει στην

κατηγορία των τριτερπενίων απομονώθηκε από το είδος *P. emodi* και επέδειξε ανασταλτική δράση κατά του ενζύμου β-γλυκουρονιδάση³⁸⁹.

Κλινικές Μελέτες και Τοξικότητα

Οι κλινικές μελέτες που έχουν διεξαχθεί αφορούν το κλάσμα TGP της ρίζας *Paeonia lactiflora* και όχι το αρχικό εκχύλισμα. Το 2012, 10 ασθενείς με διεγνωσμένη ρευματοειδή αρθρίτιδα έλαβαν TGP (συνολικοί γλυκοσίδες παιώνιας) από το στόμα σε δόση 15 mg/kg/ημέρα για διάστημα μεγαλύτερο των 3 μηνών, ενώ άλλοι 10 ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα δεν έλαβαν TGP. Τα μονοπύρνα κύτταρα του περιφερικού αίματος συλλέχθηκαν από τους ασθενείς. Η θεραπεία με TGP οδήγησε σε μειωμένο ποσοστό ώριμων κυττάρων DC και Th1/Th7 στο πειφερικό αίμα των ασθενών. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με προηγούμενα *in vivo* πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε μύες. Μελέτη επίσης έδειξε ότι το TGP περιέχει ως κύριο συστατικό την παιωνιφλορίνη (90%), η οποία όμως απορροφάται σε μικρό ποσοστό από τη γαστρεντερική οδό, έχει περιορισμένη βιοδιαθεσιμότητα (3-4%) και θα πρέπει να βρεθούν παράγωγά της για να χορηγηθούν επιτυχώς σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα⁴²⁰.

Ακόμη το TGP έχει δοκιμαστεί και σε άλλες κλινικές μελέτες για την αποτελεσματικότητά του στη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Έχει ελεγχθεί σε μελέτη 80 ασθενών, όπου οι μισοί λάμβαναν TGP και λεφλουνομίδα, ενώ οι υπόλοιποι λάμβαναν μόνο λεφλουνομίδα (αντιρευματικός παράγοντας). Ο συνδυασμός αποδείχτηκε αποτελεσματικότερος. Ομοίως, σε κλινική μελέτη 60 ασθενών η συγχορήγηση του TGP με τη μεθοτρεξάτη επέφερε καλύτερα θεραπευτικά αποτελέσματα από τη μονοθεραπεία με μεθοτρεξάτη. Σε άλλη μελέτη 180 ασθενείς έλαβαν TGP με μεθοτρεξάτη και 80 ασθενείς έλαβαν μεθοτρεξάτη και σουλφασαλαζίνη, με την πρώτη ομάδα να εμφανίζει ταχύτερη έναρξη θεραπευτικού αποτελέσματος και λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες. Κλινικές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας του μεταβολίτη στην ψωριασική αρθρίτιδα, την κνίδωση, τη γυροειδή αλωπεκία, το σύνδρομο Sjögren και το συστηματικό ερυθρεμάτωδη λύκο.

Υπάρχει περιορισμένη αξιόπιστη πληροφορία γύρω από τις φαρμακολογικές επιδράσεις και τα κύρια συστατικά της δρόγης *Paeoniae radix alba*. Αρκετές μελέτες είναι διαθέσιμες και αφορούν το συνδυασμό της παιώνιας με άλλα βότανα παραδοσιακής κινεζικής θεραπευτικής ή παραδοσιακής ιαπωνικής θεραπευτικής ή με συμβατικές θεραπείες, όπου δεν είναι δυνατή η εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων σχετικά με το αν η παιώνια είναι αυτή που είναι υπεύθυνη για τη δράση κάθε φορά.

Γενικά δεν υπάρχει καταγεγραμμένη κάποια σοβαρή ανεπιθύμητη ενέργεια της δρόγης (*Paeoniae radix alba*) και του TGP κατά τη διάρκεια των κλινικών μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί. Συμπτώματα από το γαστρεντερικό σύστημα, όπως ήπιας μορφής διάρροια η οποία όμως υποχωρεί χωρίς φαρμακευτική αγωγή σε διάστημα 1-2 εβδομάδων, είναι οι μοναδικές ανεπιθύμητες επιδράσεις που έχουν αναφερθεί. Επίσης, υπάρχουν ενδείξεις οι οποίες προκύπτουν από την παραδοσιακή χρήση της δρόγης και σχετίζονται με την εκτριωτική της δράση, οπότε αντενδείκνυται η χρήση της από εγκύους⁴²¹. Ως προς τις αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα, έχει παρατηρηθεί μόνο η αλληλεπίδραση με ένα αντιεπιληπτικό φάρμακο, την φαινυντοΐνη, όπου κατά τη συγχορήγηση TGP και φαινυντοΐνης αυξήθηκε ο χρόνος ημιζωής της δεύτερης. Τέλος, φαίνεται να αλληλεπιδρά με τα φυτικά είδη *Fritillaria verticillata*, *Cuscuta japonica* και *Rheum officinale*. Υδατικά και μεθανολικά εκχυλίσματα της ρίζας δεν παρουσιάζουν μεταλαξιογόνο δράση *in vitro*⁴²².

Σκευάσματα παραδοσιακής κινεζικής θεραπευτικής και ομοιοπαθητικά τα οποία περιέχουν *Paeoniae radix alba* κυκλοφορούν στην Κίνα. Στην Ευρώπη δεν κυκλοφορεί σκεύασμα το οποίο να περιέχει παιώνια. Αξίζει να σημειωθεί ότι η Επιτροπή για τα Φυτικά Φαρμακευτικά Προϊόντα (HMPC) του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Φαρμάκων (EMA) δεν έκανε αποδεκτή τη δημιουργία μονογραφίας της *Paeonia lactiflora* radix (*Paeoniae radix alba*, Bai Shao) ως φυτικό φάρμακο παραδοσιακής θεραπευτικής ή καλώς καθιερωμένης χρήσης, καθώς έκρινε τα στοιχεία της ασφάλειας, του καθορισμού της απαραίτητης θεραπευτικής περιόδου και της οδού χορήγησης ανεπαρκή (ορίζεται ως public statement) (31.01.2017)⁴²³.

14.3 Πειραματικό Μέρος

14.3.1 Εκχυλίσεις και Έλεγχος χημικού φορτίου ολικών εκχυλισμάτων

Μικρές ποσότητες των ριζών και των ανθισμένων υπέργειων τμημάτων του είδους *Paeonia moutanensis* συλλέχθηκαν τον Απρίλιο του 2016 από ιδιωτικό κήπο σπιτιού σε υψόμετρο 1200-1300 m στην περιοχή Έλατος του όρους Παρνασσός. Η συλλογή του φυτικού υλικού έγινε προσεκτικά και με σεβασμό στον ενδημισμό και στην ανάγκη προστασίας του περιορισμένου αριθμού ατόμων του φυτικού είδους. Ακολούθησε φύλαξη των συλλεχθέντων τμημάτων σε βαθεία κατάψυξη (-80 °C), έως ότου πραγματοποιήθηκε η ξήρανση με τη χρήση λυοφιλοποιητή και η κονιοποίηση. Κατόπιν τα δύο φυτικά υλικά εκχυλίστηκαν με τη χρήση υπερήχων

χρησιμοποιώντας διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας: διχλωρομεθάνιο (DCM) και μεθανόλη:νερό 50:50 (MeOH:H₂O 50:50). Για κάθε σύστημα εκχύλισης πραγματοποιήθηκαν 2 κύκλοι της διαδικασίας, διάρκειας 30 λεπτών ο καθένας, αποφεύγοντας τη θέρμανση του υλικού (σταθερή θερμοκρασία 20-25 °C). Στην περίπτωση παρασκευής υδατοαλκοολικών εκχυλισμάτων παρατάθηκε η διαβροχή του υλικού (δεύτερος κύκλος) για 12h προκειμένου να γίνει δυνατή η εξαντλητική παραλαβή των συστατικών. Οι διαλύτες εκχύλισης απομακρύνονταν κάθε φορά με τη χρήση Rotavapor ή λυοφιλοποίησης, όταν υπήρχε νερό, ενώ τα ξηρά εκχυλίσματα αποθηκεύονταν σε σκουρόχρωμα φιαλίδια. Οι αποδόσεις των εκχυλίσεων φαίνονται παρακάτω:

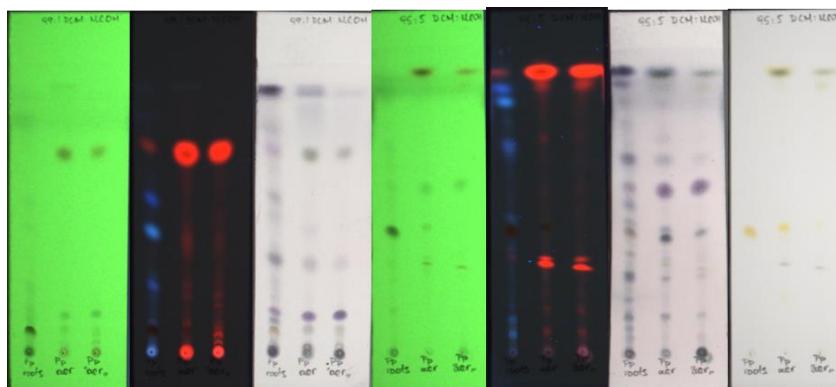
Υπέργεια τμήματα σε άνθηση (βάρους σκόνης 35 g):

- διχλωρομεθανικό εκχύλισμα 1.1 g (απόδοση: 3.25%) (κωδικός εκχυλίσματος: PPAA)
- υδατοαλκοολικό εκχύλισμα: 10.0 g (απόδοση: 28.57%) (κωδικός εκχυλίσματος: PPAC)

Ρίζες (βάρους σκόνης 57 g):

- διχλωρομεθανικό εκχύλισμα 0.6 g (απόδοση: 1.09%) (κωδικός εκχυλίσματος: PPRA)
- υδατοαλκοολικό εκχύλισμα: 6.2 g (απόδοση: 10.88%) (κωδικός εκχυλίσματος: PPRC)

Το χημικό φορτίο των παραληφθέντων εκχυλισμάτων ελέγχθηκε με υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας (LC-MS) (βλ. παράρτημα) και με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) όπως φαίνεται παρακάτω:



Εικόνα 172. TLC κανονικής φάσης διχλωρομεθανικών εκχυλισμάτων της ρίζας (PPRA) και των υπέργειων τμημάτων (PPAA) της *P. parnassica* σε συστήματα ανάπτυξης DCM:MeOH 99:1 και 95:5

Επίσης πραγματοποιήθηκε δοκιμαστική υπερκρίσιμη εκχύλιση (SFE) σε 66 g νωπής ρίζας *P. Parnassica*, στις συνθήκες που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. Σκοπός του

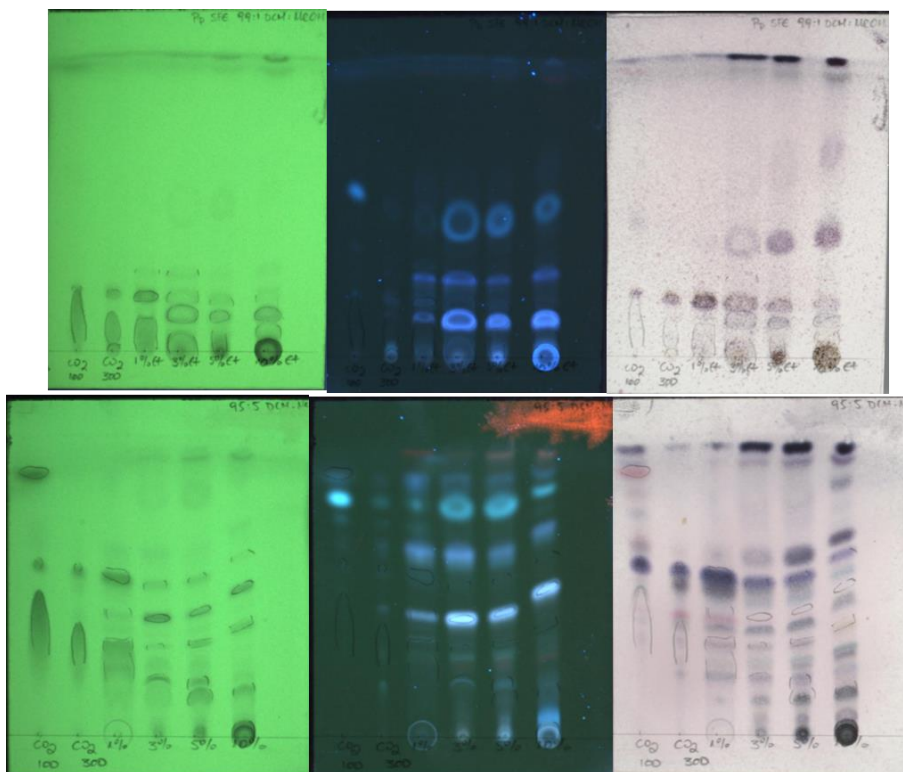
πειράματος ήταν η σύγκριση του χημικού φορτίου και της βιολογικής δράσης των εκχυλισμάτων που προέκυψαν με την τεχνική SFE σε σχέση με αυτά που παρελήφθησαν με τη χρήση υπερήχων. Ο σχεδιασμός του πειράματος και η επιλογή των συνθηκών λειτουργίας έγιναν εμπειρικά, λόγω της ελλιπούς βιβλιογραφίας στις διεργασίες SFE για τα είδη του γένους *Paeonia*, ενώ στόχος ήταν η παραλαβή μεγάλου εύρους μη πολικών συστατικών.

Πίνακας 73. Συνθήκες υπερκρίσιμης εκχύλισης της ρίζας *P. parnassica*

ΚΩΔΙΚΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ	ΕΚΧΥΛΙΣΤΗΡΑΣ		ΡΟΗ (kg/h)	ΑΙΘΑΝΟΛΗ (%)	ΔΙΑΧΩΡΙΣΤΗΡΕΣ		ΒΑΡΟΣ (g)
	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ (°C)	ΠΙΕΣΗ (bar)			ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ (°C)	ΠΙΕΣΗ (bar)	
Ppr100	40	100	1.0	0	21	60	0.21*
Ppr300	40	300	1.0	0	40	60	0.71*
PprE1	40	300	1.0	1	40	60	4.94*
PprE3	40	300	1.0	3	40	60	0.04
PprE5	40	300	1.0	5	40	60	0.05
PprE10	40	300	1.0	10	40	60	0.12

*Στα δείγματα αυτά υπήρχε υγρασία

Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε περιλάμβανε αρχικά την εκχύλιση του φυτού με υπερκρίσιμο CO₂, χωρίς την προσθήκη συνδιαλύτη, σε ήπιες συνθήκες (πίεση 100 bar) για την παραλαβή του άπολου, πτητικού εκχυλίσματος (Ppr100) και στη συνέχεια την αύξηση της πίεσης (300 bar) για την παραλαβή του άπολου, μη πτητικού εκχυλίσματος (Ppr300). Με την προσθήκη συνεχώς αυξανόμενου ποσοστού συνδιαλύτη-αιθανόλης (1%, 3%, 5% και 10%) έγινε δυνατή η ανάκτηση πιο πολικών συστατικών (εκχυλίσματα PprE1, PprE3, PprE5, PprE10). Το κάθε στάδιο της εκχύλισης πραγματοποιούνταν μέχρι εξάντλησης. Το πρώτο εκχύλισμα των πτητικών και άπολων συστατικών του φυτού είχε μειωμένη απόδοση καθώς η περιεκτικότητα της ρίζας σε αιθέριο έλαιο είναι αρκετά χαμηλή (περίπου 0.14%)³⁸⁷. Ωστόσο το άρωμα το οποίο έβγαινε από τη συσκευή κατά τη διαδικασία της εκχύλισης ήταν πολύ ευχάριστο θυμίζοντας αυτό του φρέσκου φυτού. Στη συνέχεια τα εκχυλίσματα της SFE ελέχθησαν ως προς χημικό τους φορτίο με υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας (LC-MS) (βλ. παράρτημα) και χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), που φαίνεται παρακάτω. Ο έλεγχος έδειξε ότι τα πρώτα κλάσματα της διεργασίας (Ppr100 και Ppr300) είναι πλούσια σε λιπαρά συστατικά και τερπενοειδή, ενώ τα πιο πολικά εκχυλίσματα λόγω της αύξησης της πίεσης και της παρουσίας του συνδιαλύτη (PprE1, PprE3, PprE5, PprE10) είναι πλουσιότερα και περιέχουν πιο πολικά συστατικά.



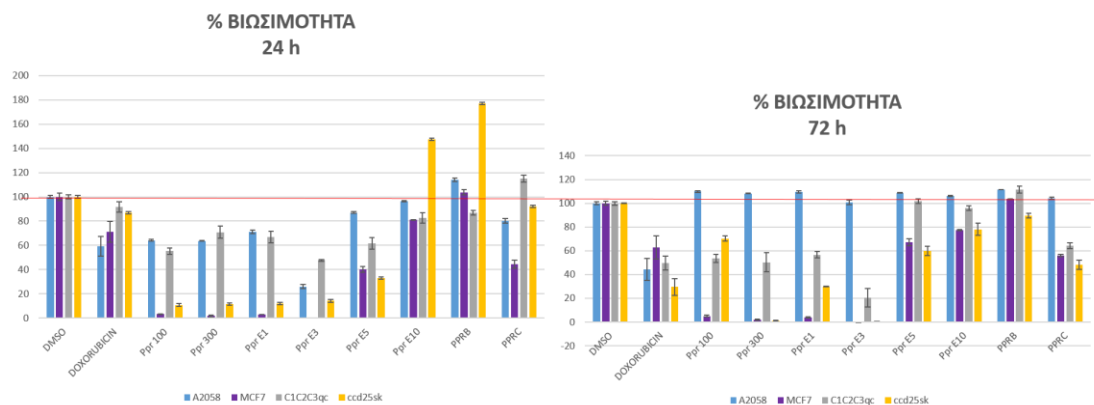
Εικόνα 173. TLC SFE εκχυλισμάτων ρίζας *Paeonia rarnassica* (Ppr100, Ppr300, PprE1, PprE3, PprE5, PprE10) σε συστήματα ανάπτυξης DCM:MeOH 99:1 και 95:5

14.3.2 Βιολογική αξιολόγηση ολικών εκχυλισμάτων

Όπως έχει αναφερθεί στη γενικότερη ενότητα της βιολογικής αξιολόγησης των εκχυλισμάτων, το μεθανολικό και υδατομεθανολικό εκχύλισμα των ριζών της *Paeonia rarnassica*, PPRB και PPRC, εμφάνισαν αξιοσημείωτη αναστολή της AChE τόσο με τη μέθοδο NA-FBB με ποσοστά $70.25 \pm 3.36\%$ και $75.71 \pm 1.02\%$ όσο και με τη μέθοδο Ellman's (PPRC: $40.07 \pm 1.36\%$). Ομοίως και το υδατομεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του φυτού, το οποίο ελέγχθηκε μόνο με τη μέθοδο Ellman's, επέδειξε $42.35 \pm 0.89\%$ αναστολή της AChE, ενώ τα εκχυλίσματα της SFE (PprE5 και PprE10) ήταν μη δραστικά. Το υδατομεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του είδους ανέστειλε τη δράση της Hyal κατά $56.35 \pm 3.10\%$, ενώ της ρίζας κατά $33.56 \pm 0.69\%$.

Τα αποτελέσματα των ελέγχων κυτταροτοξικότητας παρουσιάζονται στο παρακάτω ραβδόγραμμα:

Paeonia parnassica



Εικόνα 174. Επίδραση των εκχυλισμάτων της *Paeonia parnassica* στη βιωσιμότητα των κυττάρων A2058, MCF7, C1C2C3qc και CCD-25Sk συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα, δηλαδή την ομάδα των κυττάρων που επώαστηκαν με 0.2% DMSO. Τα κύτταρα επώαστηκαν με τα εκχυλίσματα (συγκέντρωση 250μg/mL) για 24 και 72 ώρες προτού εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. Οι αριθμοί των κυττάρων παρουσιάζονται ως % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± SEM. Ως πρότυπη ουσία χρησιμοποιήθηκε η δοξορουβικίνη

Όλα τα εκχυλίσματα της παιώνιας παρουσίασαν σημαντικές κυτταροτοξικές δράσεις και μερικά αποδείχτηκαν από τα πιο ισχυρά κυτταροτοξικά εκχυλίσματα στο σύνολο των εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή. Τα αρχικά εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν με SFE (Ppr 100, Ppr 300, Ppr E1, Ppr E3) παρουσιάζουν παρόμοιο προφίλ τοξικότητας στις 24 ώρες. Συγκεκριμένα τα εκχυλίσματα αυτά εμφανίζονται να είναι ισχυρά τοξικά στα MCF-7 και στα φυσιολογικά κύτταρα, αλλά όχι τόσο τοξικά στις άλλες δύο σειρές μολονότι και σε αυτές τις κυτταρικές σειρές οι δράσεις τους είναι ισχυρότερες από τη δοξορουβικίνη. Το εκχύλισμα Ppr E3 φαίνεται να είναι το πιο τοξικό, μη επιδεικνύοντας ιδιαίτερη εκλεκτικότητα στην κυτταροτοξική του δράση. Από τα πολικά εκχυλίσματα των ριζών, το PPRC (υδατοαλκοολικό) είναι το πιο ισχυρό, με αξιοσημείωτη δράση εναντίον των MCF-7, ισχυρότερη της δοξορουβικίνης και μη τοξικότητα στα φυσιολογικά κύτταρα. Σχεδόν ίδια εικόνα παρατηρείται και στις 72 ώρες, με τα εκχυλίσματα της τεχνικής SFE να δείχνουν τα καλύτερα αποτελέσματα, με καλύτερη τη δράση του Ppr 100 στα φυσιολογικά κύτταρα. Το υδατοαλκοολικό εκχύλισμα των ριζών παραμένει αποτελεσματικότερο έναντι των MCF-7 συγκριτικά με τη δοξορουβικίνη. Κανένα από τα εκχυλίσματα δεν ήταν δραστικό στην καρκινική σειρά μελανώματος, A2058.

14.3.3 Κλασμάτωση υδατοαλκοολικών εκχυλισμάτων PPAC και PPRC με φυγόκεντρο χρωματογραφία κατανομής (FCPC)

Τα υδατομεθανολικά εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων και των ριζών του είδους *Paeonia parnassica* (Κωδικοί εκχυλισμάτων: PPAC και PPRC) μελετήθηκαν περαιτέρω φυτοχημικά και φαρμακολογικά, λόγω μεγαλύτερου ενδιαφέροντος αλλά και λόγω επαρκούς ποσότητας σε αντίθεση π.χ. με τα SFE εκχυλίσματα.

- ❖ Υδατομεθανολικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων του είδους *Paeonia parnassica* (Κωδικός εκχυλίσματος: PPAC):

Επιλογή συστήματος:

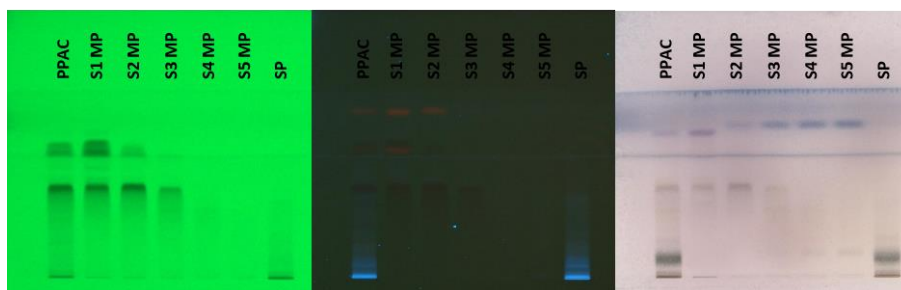
Με βάση την πολικότητα και τη διαλυτότητα του εκχυλίσματος καθώς και την υπάρχουσα σχετική βιβλιογραφία⁴²⁴ έγιναν οι παρακάτω δοκιμές:

Αρχικά δοκιμάστηκε ένα σύνολο συστημάτων βαθμιδωτής έκλουσης βασιζόμενο στα συστήματα Oka¹⁴³, τα οποία περιέχουν 5 διαλύτες (επτάνιο (Heptane), οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc), βουτανόλη (BuOH), μεθανόλη (MeOH), νερό (H₂O)) και χαρακτηρίζονται από ικανοποιητικό, γρήγορο και σε καλή αναλογία διαχωρισμό των 2 φάσεων.

Πίνακας 74. Συστήματα βαθμιδωτής έκλουσης που δοκιμάστηκαν για την FCPC κλασμάτωση του εκχυλίσματος PPAC (1^η δοκιμή)

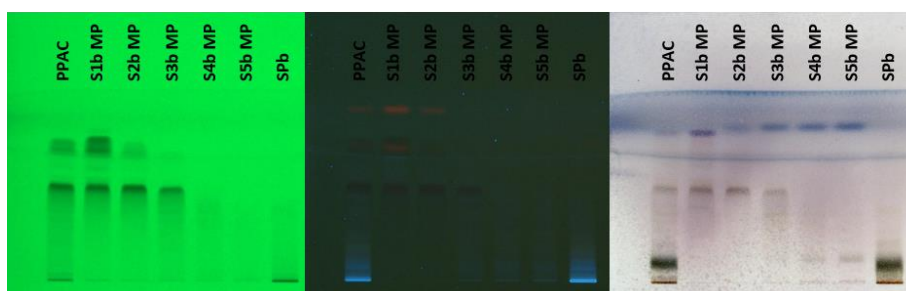
<u>Σύστημα</u>	Heptane	EtOAc	BuOH	MeOH	H ₂ O	Σχόλια
<u>S1</u>	1.0	5.0	0.0	1.0	5.0	Αργός διαχωρισμός φάσεων/γαλάκτωμα
<u>S2</u>	1.0	4.5	0.5	1.0	5.0	Πιο γρήγορος διαχωρισμός φάσεων/γαλάκτωμα
<u>S3</u>	0.5	4.0	1.5	1.0	5.0	Καλύτερος διαχωρισμός/όχι γαλάκτωμα
<u>S4</u>	0.5	3.0	2.5	1.0	5.0	Γρήγορος διαχωρισμός/όχι γαλάκτωμα
<u>S5</u>	0.5	2.0	4.5	1.0	5.0	Γρήγορος διαχωρισμός/λίγο γαλάκτωμα

Τα αποτελέσματα του διαχωρισμού με αυτά τα συστήματα φαίνονται στην παρακάτω TLC:



Εικόνα 175. TLC κατανομής συστατικών με χρήση του πρώτου δοκιμαστικού συνδυασμού συστημάτων για την FCPC κλασμάτωση του εκχυλίσματος PPAC (PPAC:αρχικό εκχύλισμα, S1 MP:κινητή φάση 1ου συστήματος, S2 MP:κινητή φάση 2ου συστήματος, S3 MP:κινητή φάση 3ου συστήματος, S4 MP:κινητή φάση 4ου συστήματος, S5 MP:κινητή φάση 5ου συστήματος, SP: Στατική φάση (κάτω φάση)). Σύστημα ανάπτυξης: EtOAc/MeOH/H₂O/FA 50/10/7/1

Εν συνεχεία, δοκιμάστηκαν τα παραπάνω συστήματα με προσθήκη 0.1% οξικού οξέος. Η εικόνα της κατανομής των συστατικών και του διαχωρισμού των δύο φάσεων ήταν καλύτερη σε σχέση με το παραπάνω, με εξαίρεση τα συστήματα S2 όπου πάλι υπήρχε αργός διαχωρισμός φάσεων και γαλάκτωμα και S6 όπου υπήρχε πρόβλημα γαλακτώματος και διαχωρισμού φάσεων.



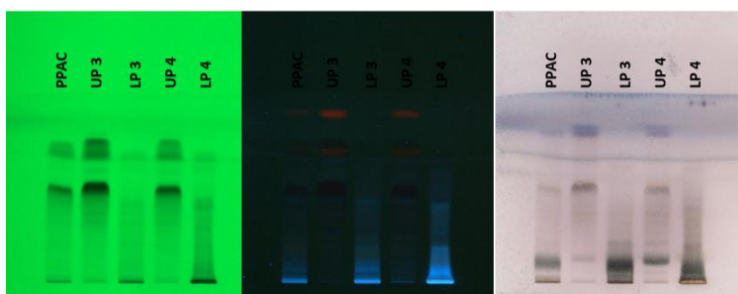
Εικόνα 176. TLC κατανομής συστατικών με χρήση του δεύτερου δοκιμαστικού συνδυασμού συστημάτων για την FCPC κλασμάτωση του εκχυλίσματος PPAC (PPAC:αρχικό εκχύλισμα, S1b MP:κινητή φάση 1^{ου} συστήματος, S2b MP:κινητή φάση 2^{ου} συστήματος, S3b MP:κινητή φάση 3^{ου} συστήματος, S4b MP:κινητή φάση 4^{ου} συστήματος, S5b MP:κινητή φάση 5^{ου} συστήματος, SPb: Στατική φάση (κάτω φάση)). Σύστημα ανάπτυξης: EtOAc/MeOH/H₂O/FA 50/10/7/1

Σαν τρίτος (3^ο) και τέταρτος (4^ο) συνδυασμός συστημάτων δοκιμάστηκαν δύο ισοκρατικά συστήματα που έχουν περιγραφεί από τον Ito¹⁴³, περιλαμβάνουν το συνδυασμό τεσσάρων διαλυτών, οι οποίοι είναι μεθυλ-*tert*-βουτυλαιθέρας (MTBE), βουτανόλη (BuOH), ακετονιτρίλιο (ACN) και νερό (H₂O), και εμφάνισαν καλό και γρήγορο διαχωρισμό φάσεων, οι οποίες μεταξύ τους είχαν αναλογία 50:50 (στο 3^ο σύστημα) πριν την προσθήκη δείγματος.

Πίνακας 75. Συστήματα βαθμιδωτής έκλουσης που δοκιμάστηκαν για την FCPC κλασμάτωση του εκχυλίσματος PPAC (2^η δοκιμή)

Σύστημα	MTBE	BuOH	ACN	H ₂ O	Σχόλια
<u>3</u> ^ο	2.0	2.0	1.0	5.0	Γρήγορος διαχωρισμός φάσεων (1-2min) σε αναλογία 1:1/ελάχιστο γαλάκτωμα
<u>4</u> ^ο	6.0	4.0	5.0	5.0	Καλός διαχωρισμός φάσεων σε αναλογία (πάνω : κάτω φάση) 3:1/όχι γαλάκτωμα

Ωστόσο τα συστατικά του εκχυλίσματος δεν εμφάνισαν ικανοποιητική κατανομή μεταξύ των 2 φάσεων, όπως φαίνεται από την παρακάτω TLC.

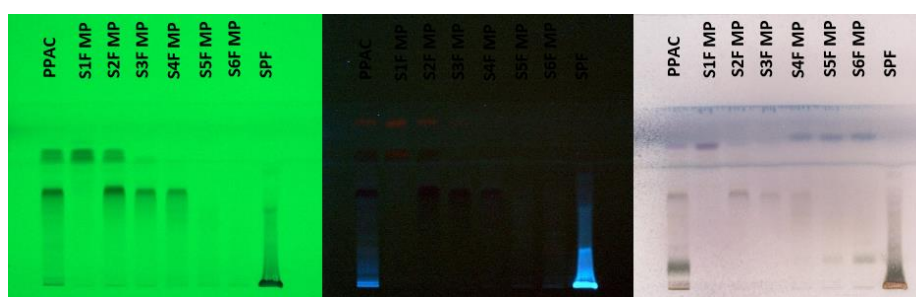


Εικόνα 177. TLC κατανομής συστατικών με χρήση του τρίτου και τέταρτου δοκιμαστικού συστήματος για την FCPC κλασμάτωση του εκχυλίσματος PPAC (PPAC:αρχικό εκχύλισμα, UP 3:πάνω φάση 3ου συστήματος, LP 3:κάτω φάση 3ου συστήματος, UP 4:πάνω φάση 4ου συστήματος, LP 4:κάτω φάση 4ου συστήματος). Σύστημα ανάπτυξης: EtOAc/MeOH/H₂O/FA 50/10/7/1

Ακολούθησαν και άλλες δοκιμές στις οποίες εξετάστηκαν συστήματα που αποτελούν παραλλαγές των συστημάτων Oka, ενώ έγινε αντικατάσταση της μεθανόλης από αιθανόλη, η οποία δεν είχε σημαντική επίδραση. Αντίθετα, η αντικατάσταση του επτανίου από εξάνιο συνέβαλε στον καλύτερο και γρηγορότερο διαχωρισμό των φάσεων, χωρίς τη δημιουργία γαλακτώματος μετά την προσθήκη δείγματος. Τελικά επιλέχθηκε ο παρακάτω συνδυασμός συστημάτων βαθμιδωτής έκλουσης για την FCPC κλασμάτωση του εκχυλίσματος PPAC, ο οποίος εμφάνισε γρήγορο διαχωρισμό φάσεων, χωρίς γαλάκτωμα και με αναλογία 1:1 μεταξύ στατικής και κινητής φάσης σε όλα τα στάδια της δοκιμασίας, αν και μετά την προσθήκη βουτανόλης καθυστερεί λίγο ο διαχωρισμός των φάσεων. Επίσης, η κατανομή των συστατικών του εκχυλίσματος κρίθηκε ικανοποιητική.

Πίνακας 76. Συνδυασμός συστημάτων βαθμιδωτής έκλουσης με τον οποίο πραγματοποιήθηκε η FCPC κλασμάτωση του εκχυλίσματος PPAC

Σύστημα	Hexane	EtOAc	BuOH	MeOH	H ₂ O
S1F	2.0	4.0	0.0	1.0	5.0
S2F	1.0	5.0	0.0	1.0	5.0
S3F	1.0	4.5	0.5	1.0	5.0
S4F	0.5	4.0	1.5	1.0	5.0
S5F	0.5	3.0	2.5	1.0	5.0
S6F	0.5	2.0	4.5	1.0	5.0



Εικόνα 178. TLC κατανομής συστατικών με χρήση του συνδυασμού συστημάτων επιλογής για την FCPC κλασμάτωση του εκχυλίσματος PPAC (PPAC:αρχικό εκχύλισμα, S1F MP:κινητή φάση 1^{ου} συστήματος, S2F MP:κινητή φάση 2^{ου} συστήματος, S3F MP:κινητή φάση 3^{ου} συστήματος, S4F MP:κινητή φάση 4^{ου} συστήματος, S5F MP:κινητή φάση 5^{ου} συστήματος, S6F MP:κινητή φάση 6^{ου} συστήματος, SPF:στατική φάση (κάτω φάση). Σύστημα ανάπτυξης: EtOAc/MeOH/H₂O/FA 50/10/7/1

Πειραματική διαδικασία:

Ποσότητα 7 g του υδατομεθανολικού εκχυλίσματος PPAC κλασματώθηκε με διαδικασία βαθμιδωτής έκλουσης-εξώθησης με χρήση του παραπάνω συνδυασμού συστημάτων, όπου μετά τη διοχέτευση και της έκτης κινητής φάσης, διοχετεύθηκε στατική φάση προκειμένου αυτή να παρασύρει τα πιο πολικά συστατικά του εκχυλίσματος. Οι συνθήκες του πειράματος φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 77. Συνθήκες FCPC κλασμάτωσης του εκχυλίσματος PPAC

Βάρος εκχυλίσματος	7 g
Διαλύτες	Hexane/EtOAc/BuOH/MeOH/H ₂ O
Στροφές	700 rpm
Ροή	7 mL/min
Κινητή φάση	πάνω φάση (οργανική)

Στατική φάση	κάτω φάση (υδατική)
Ρύθμιση	Ascending
Αλλαγή φάσεων	96 κλάσμα

Συγκεκριμένα η εξισορρόπηση του συστήματος πραγματοποιήθηκε στην αναλογία 750mL στατικής φάσης : 250 mL κινητής φάσης, αν και υπήρξε απώλεια στατικής φάσης στην πορεία. Το εκχύλισμα διαλύθηκε σε μείγμα 50:50 στατικής (κάτω): κινητής (πάνω) φάσης (χρησιμοποιήθηκε loop 30 mL). Συλλέχθηκαν 134 κλάσματα όγκου 50 mL το καθένα, τα οποία συνενώθηκαν σε 60 κλάσματα με βάση το χημικό τους φορτίο στη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Οι συνενώσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν λίγες, έτσι ώστε να εφαρμοστεί επιτυχώς η τεχνική HetCA που ακολούθησε, στην οποία είναι αναγκαία η διακύμανση της συγκέντρωσης των ουσιών στα κλάσματα. Η απόδοση του χρωματογραφικού διαχωρισμού ήταν 91.3%.

Πίνακας 78. Συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν από την FCPC κλασμάτωση του εκχυλίσματος PPAC

ΚΩΔΙΚΟΣ CPC	ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΒΑΡΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ (mg)
Ppa CPC FR0	Ppa FR0	2.3
Ppa CPC FR1	Ppa FR1	71.4
Ppa CPC FR2	Ppa FR2	11.3
Ppa CPC FR3-4	Ppa FR3	6.7
Ppa CPC FR5-6	Ppa FR4	17.5
Ppa CPC FR7-8	Ppa FR5	64.6
Ppa CPC FR9	Ppa FR6	28.4
Ppa CPC FR10	Ppa FR7	42
Ppa CPC FR11-12	Ppa FR8	100.8
Ppa CPC FR13-14	Ppa FR9	26.4
Ppa CPC FR15	Ppa FR10	3.1
Ppa CPC FR16-18	Ppa FR11	7.7
Ppa CPC FR19-21	Ppa FR12	7.6
Ppa CPC FR22-24	Ppa FR13	7.5
Ppa CPC FR25-27	Ppa FR14	5.7
Ppa CPC FR28	Ppa FR15	3.1
Ppa CPC FR29	Ppa FR16	4.9
Ppa CPC FR30-31	Ppa FR17	15.2
Ppa CPC FR32-33	Ppa FR18	12.3
Ppa CPC FR34	Ppa FR19	5.1
Ppa CPC FR35	Ppa FR20	6.6

Ppa CPC FR36-38	Ppa FR21	45.9
Ppa CPC FR39-41	Ppa FR22	84.5
Ppa CPC FR42-43	Ppa FR23	76.7
Ppa CPC FR44-45	Ppa FR24	71.8
Ppa CPC FR46-47	Ppa FR25	64.6
Ppa CPC FR48	Ppa FR26	85.6
Ppa CPC FR49	Ppa FR27	182.8
Ppa CPC FR50	Ppa FR28	80.2
Ppa CPC FR51-52	Ppa FR29	140.0
Ppa CPC FR53	Ppa FR30	38.0
Ppa CPC FR54-56	Ppa FR31	45.6
Ppa CPC FR57	Ppa FR32	11.4
Ppa CPC FR58-61	Ppa FR33	39.5
Ppa CPC FR62	Ppa FR34	18.3
Ppa CPC FR63	Ppa FR35	31.4
Ppa CPC FR64-65	Ppa FR36	41.1
Ppa CPC FR66-67	Ppa FR37	46
Ppa CPC FR68-70	Ppa FR38	44.9
Ppa CPC FR71-72	Ppa FR39	28.9
Ppa CPC FR73-75	Ppa FR40	33.6
Ppa CPC FR76	Ppa FR41	7.7
Ppa CPC FR77-78	Ppa FR42	20.1
Ppa CPC FR79-80	Ppa FR43	22.6
Ppa CPC FR81	Ppa FR44	9.4
Ppa CPC FR82	Ppa FR45	9.7
Ppa CPC FR83-84	Ppa FR46	19.1
Ppa CPC FR85-87	Ppa FR47	24.5
Ppa CPC FR88-92	Ppa FR48	34.4
Ppa CPC FR93-95	Ppa FR49	25.4
Ppa CPC FR96-104	Ppa FR50	26.7
Ppa CPC FR105-112	Ppa FR51	21.7
Ppa CPC FR113-120	Ppa FR52	20.1
Ppa CPC FR121-125	Ppa FR53	25.8
Ppa CPC FR126-127	Ppa FR54	33.0
Ppa CPC FR128	Ppa FR55	24.2
Ppa CPC FR129	Ppa FR56	45.9
Ppa CPC FR130	Ppa FR57	349.7
Ppa CPC FR131	Ppa FR58	2.418.2
Ppa CPC FR132	Ppa FR59	1.423.1
Ppa CPC FR133-134	Ppa FR60	168.0

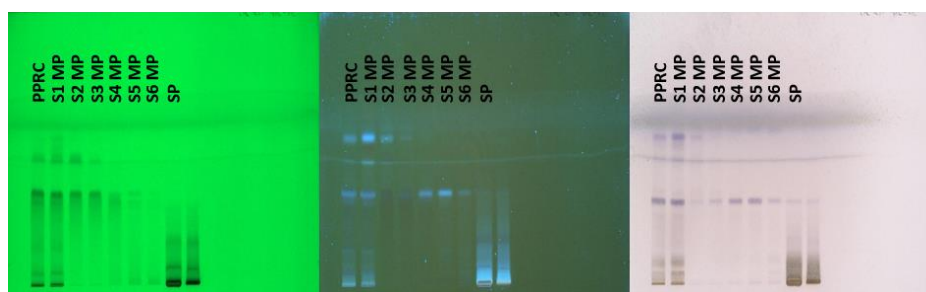
- ❖ Υδατομεθανολικό εκχύλισμα ριζών του είδους *Paeonia parnassica* (Κωδικός εκχυλίσματος: PPRC):

Επιλογή συστήματος

Δοκιμάστηκε ο παρακάτω συνδυασμός συστημάτων βαθμιδωτής έκλουσης, που είναι παραλλαγή των συστημάτων Oka¹⁴³ και προκύπτει από την ανάμειξη πέντε διαλυτών (Heptane, EtOAc, BuOH, MeOH, H₂O). Από αυτόν απορρίφθηκαν τα S1 και S6 λόγω σχηματισμού γαλακτώματος και αργού διαχωρισμού μεταξύ των δύο φάσεων και επιλέχθηκε η χρήση των υπόλοιπων συστημάτων (S2, S3, S4, S5) για την κλασμάτωση του εκχυλίσματος. Η κατανομή των συστατικών σε κάθε φάση ήταν ικανοποιητική και φαίνεται στην αντίστοιχη TLC.

Πίνακας 79. Συνδυασμός συστημάτων βαθμιδωτής έκλουσης με τον οποίο πραγματοποιήθηκε η FCPC κλασμάτωση του εκχυλίσματος PPRC (απορρίφθηκαν τα S1, S6)

<u>Σύστημα</u>	Heptane	EtOAc	BuOH	MeOH	H ₂ O
<u>S1</u>	2.0	4.0	0.0	1.0	5.0
<u>S2</u>	1.0	5.0	0.0	1.0	5.0
<u>S3</u>	1.0	4.5	0.5	1.0	5.0
<u>S4</u>	0.5	4.0	1.5	1.0	5.0
<u>S5</u>	0.5	3.0	2.5	1.0	5.0
<u>S6</u>	0.5	2.0	4.5	1.0	5.0
<u>Extrusion</u>	2.0	4.0	0.0	1.0	5.0



Εικόνα 179. TLC κατανομής συστατικών με χρήση του συνδυασμού συστημάτων επιλογής για την FCPC κλασμάτωση του εκχυλίσματος PPRC (PPRC:αρχικό εκχύλισμα, S1 MP:κινητή φάση 1^{ου} συστήματος, S2 MP:κινητή φάση 2^{ου} συστήματος, S3 MP:κινητή φάση 3^{ου} συστήματος, S4 MP:κινητή φάση 4^{ου} συστήματος, S5 MP:κινητή φάση 5^{ου}

συστήματος, S6 MP:κινητή φάση 6^{ου} συστήματος, SP:στατική φάση (κάτω φάση)). Σύστημα ανάπτυξης: EtOAc/MeOH/H₂O/FA 50/10/7/1

Πειραματική διαδικασία

Ποσότητα 6 g του υδατομεθανολικού εκχυλίσματος PPRC κλασματώθηκε με διαδικασία βαθμιδωτής έκλουσης με χρήση της παραπάνω αλληλουχίας συστημάτων (S2, S3, S4, S5) όπου μετά τη διοχέτευση και της πέμπτης κινητής φάσης, διοχετεύθηκε στατική φάση με αλλαγή της κατεύθυνσης ροής (dual mode) προκειμένου να παρασυρθούν και να κλασματωθούν τα πιο πολικά συστατικά του εκχυλίσματος και να ολοκληρωθεί ο διαχωρισμός τους. Οι συνθήκες του πειράματος φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 80. Συνθήκες FCPC κλασμάτωσης του εκχυλίσματος PPRC

Βάρος εκχυλίσματος	6 g
Διαλύτες	Heptane/EtOAc/BuOH/MeOH/H ₂ O
Στροφές	600 rpm
Ροή	5 mL/min
Κινητή φάση	πάνω φάση (οργανική)
Στατική φάση	κάτω φάση (υδατική)
Ρύθμιση	Ascending
Αλλαγή φάσεων	69 κλάσμα

Η εξισορρόπηση του συστήματος πραγματοποιήθηκε στην αναλογία 750mL στατικής φάσης: 250 mL κινητής φάσης αν και υπήρξε απώλεια στατικής φάσης στην πορεία. Το εκχύλισμα διαλύθηκε μόνο στην στατική (κάτω) φάση (22 mL τοποθετήθηκαν σε loop 30 mL). Συλλέχθηκαν 84 κλάσματα όγκου 50 mL το καθένα, τα οποία συνενώθηκαν σε 73 κλάσματα με βάση την εικόνα του χημικού προφίλ τους στη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Και εδώ οι συνενώσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν λίγες έτσι ώστε να εξυπηρετηθεί η τεχνική HetCA στην οποία επιζητείται η διακύμανση της συγκέντρωσης των ουσιών στα κλάσματα. Η απόδοση του χρωματογραφικού διαχωρισμού ήταν 97.5%.

Πίνακας 81. Συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν από την FCPC κλασμάτωση του εκχυλίσματος PPRC

ΚΩΔΙΚΟΣ CPC	ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΒΑΡΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ (mg)
Ppr CPC FR1	Ppr FR1	121.7

Ppr CPC FR2	Ppr FR2	19.8
Ppr CPC FR3	Ppr FR3	29.4
Ppr CPC FR4	Ppr FR4	22.8
Ppr CPC FR5	Ppr FR5	15.4
Ppr CPC FR6	Ppr FR6	23.6
Ppr CPC FR7	Ppr FR7	26.4
Ppr CPC FR8	Ppr FR8	18.5
Ppr CPC FR9-11	Ppr FR9	40.7
Ppr CPC FR12	Ppr FR10	17.5
Ppr CPC FR13	Ppr FR11	18.9
Ppr CPC FR14	Ppr FR12	20.2
Ppr CPC FR15	Ppr FR13	16.7
Ppr CPC FR16	Ppr FR14	16.3
Ppr CPC FR17	Ppr FR15	15.3
Ppr CPC FR18	Ppr FR16	15.2
Ppr CPC FR19-20	Ppr FR17	31.1
Ppr CPC FR21	Ppr FR18	16.2
Ppr CPC FR22	Ppr FR19	16.9
Ppr CPC FR23-24	Ppr FR20	41.9
Ppr CPC FR25	Ppr FR21	18.6
Ppr CPC FR26	Ppr FR22	16.3
Ppr CPC FR27	Ppr FR23	16.2
Ppr CPC FR28	Ppr FR24	15.5
Ppr CPC FR29	Ppr FR25	15.6

Ppr CPC FR30	Ppr FR26	15.8
Ppr CPC FR31	Ppr FR27	13.8
Ppr CPC FR32-33	Ppr FR28	27.6
Ppr CPC FR34	Ppr FR29	50.6
Ppr CPC FR35	Ppr FR30	48.4
Ppr CPC FR36	Ppr FR31	27.3
Ppr CPC FR37	Ppr FR32	30.8
Ppr CPC FR38	Ppr FR33	33.5
Ppr CPC FR39	Ppr FR34	29.6
Ppr CPC FR40	Ppr FR35	19.6
Ppr CPC FR41-42	Ppr FR36	22.3
Ppr CPC FR43-45	Ppr FR37	20.9
Ppr CPC FR46	Ppr FR38	13.8
Ppr CPC FR47	Ppr FR39	29.8
Ppr CPC FR48	Ppr FR40	28.7
Ppr CPC FR49	Ppr FR41	21.6
Ppr CPC FR50	Ppr FR42	19.9
Ppr CPC FR51	Ppr FR43	18.6
Ppr CPC FR52	Ppr FR44	15.5
Ppr CPC FR53	Ppr FR45	15.1
Ppr CPC FR54	Ppr FR46	14.9
Ppr CPC FR55	Ppr FR47	14.0
Ppr CPC FR56	Ppr FR48	15.8
Ppr CPC FR57	Ppr FR49	22.1

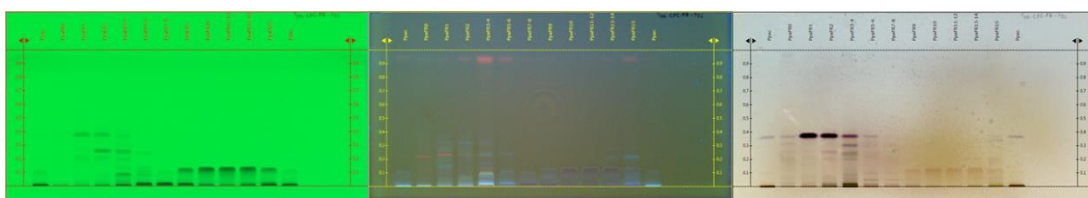
Ppr CPC FR58	Ppr FR50	39.3
Ppr CPC FR59	Ppr FR51	55.5
Ppr CPC FR60	Ppr FR52	83.0
Ppr CPC FR61	Ppr FR53	104.0
Ppr CPC FR62	Ppr FR54	129.5
Ppr CPC FR63	Ppr FR55	123.0
Ppr CPC FR64	Ppr FR56	98.2
Ppr CPC FR65	Ppr FR57	42.3
Ppr CPC FR66	Ppr FR58	32.8
Ppr CPC FR67	Ppr FR59	31.1
Ppr CPC FR68	Ppr FR60	25.2
Ppr CPC FR69	Ppr FR61	723.0
Ppr CPC FR70	Ppr FR62	1778.8
Ppr CPC FR71	Ppr FR63	892.6
Ppr CPC FR72	Ppr FR64	100.7
Ppr CPC FR73-74	Ppr FR65	105.1
Ppr CPC FR75-76	Ppr FR66	64.7
Ppr CPC FR77-78	Ppr FR67	47.4
Ppr CPC FR79	Ppr FR68	29.7
Ppr CPC FR80	Ppr FR69	19.3
Ppr CPC FR81	Ppr FR70	19.3
Ppr CPC FR82	Ppr FR71	15.9
Ppr CPC FR83	Ppr FR72	14.2
Ppr CPC WASTE	Ppr FR73	76.2

14.3.4 Έλεγχος χημικού φορτίου FCPC κλασμάτων με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC)

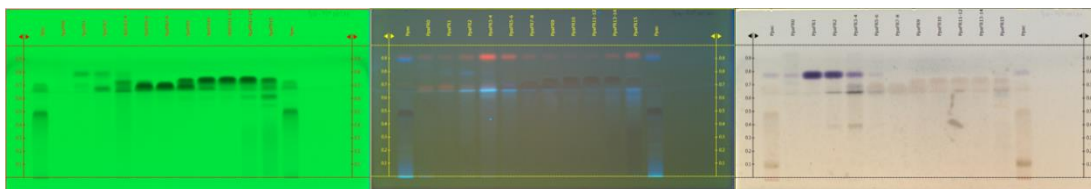
Για τον ποιοτικό έλεγχο των συνενωμένων FCPC κλασμάτων που προέκυψαν από τα εκχυλίσματα PPAC και PPRC χρησιμοποιήθηκε η τεχνική HPTLC. Τα συστήματα ανάπτυξης, οι συγκεντρώσεις και οι όγκοι των κλασμάτων που χρησιμοποιήθηκαν προέκυψαν μετά από δοκιμές και αναλύονται παρακάτω για τα δύο εκχυλίσματα.

- ❖ Υδατομεθανολικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων του είδους *Paenonia parnassica* (Κωδικός εκχυλίσματος: PPAC):

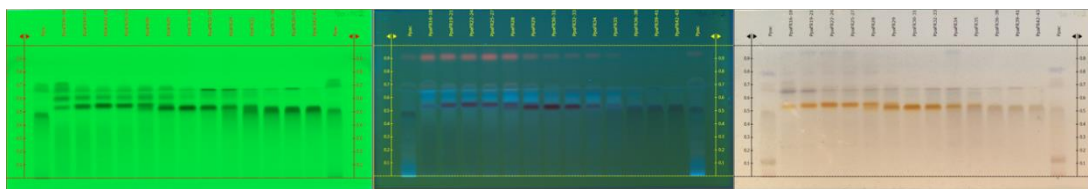
Σε κάθε πλάκα έγινε απόθεση 15 μ L από κάθε διάλυμα κλάσματος συγκέντρωσης 1 mg/mL στον κατάλληλο διαλύτη ή μείγμα διαλυτών. Τα συστήματα ανάπτυξης των πλακών επιλέχθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι δυνατή η παρατήρηση του μεγαλύτερου ποσοστού των μεταβολιτών που περιέχονται στο εκάστοτε κλάσμα. Οι ανεπτυγμένες πλάκες παρατηρήθηκαν και φωτογραφήθηκαν στα μήκη κύματος 254 και 366 nm ενώ μετά τη σάρωση των χρωματογραφημάτων και τη λήψη των φασμάτων απορρόφησης στα μήκη κύματος 200, 254, 280 και 366 nm, πραγματοποιήθηκε η εμφάνιση των πλακών σε διάλυμα θειικής βανιλίνης. Παρακάτω παρουσιάζονται οι πλάκες TLC των κλασμάτων.



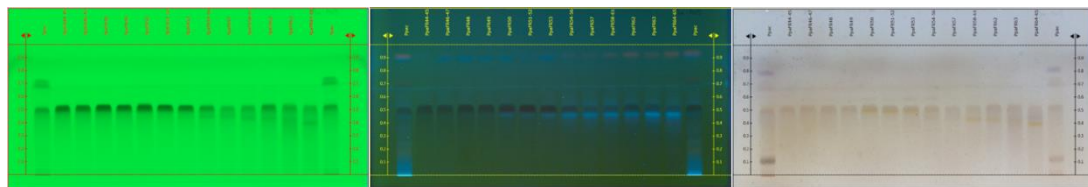
Εικόνα 180. PPAC-P01 (DCM:MeOH 95:5)-κλάσματα 0-10 (Κωδικός CPC 0-15)



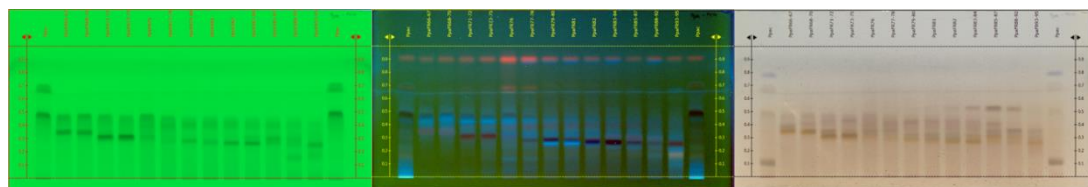
Εικόνα 181. PPAC-P01 polar (EtOAc:MeOH:H₂O:FA 50:10:7:1)-κλάσματα 0-10 (Κωδικός CPC 0-15)



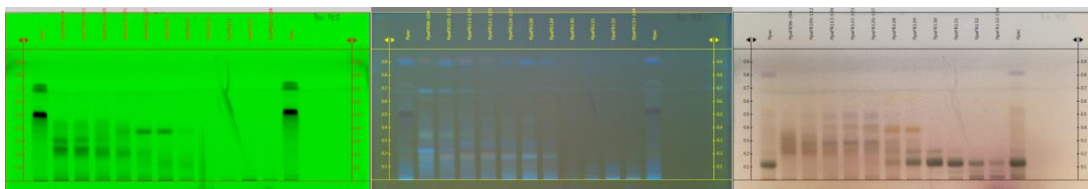
Εικόνα 182. PPAC-P02 (EtOAc:MeOH:H2O:FA 50:10:7:1)-κλάσματα 11-23 (Κωδικός CPC 16-43)



Εικόνα 183. PPAC-P03 (EtOAc:MeOH:H2O:FA 50:10:7:1)-κλάσματα 24-36 (Κωδικός CPC 44-65)



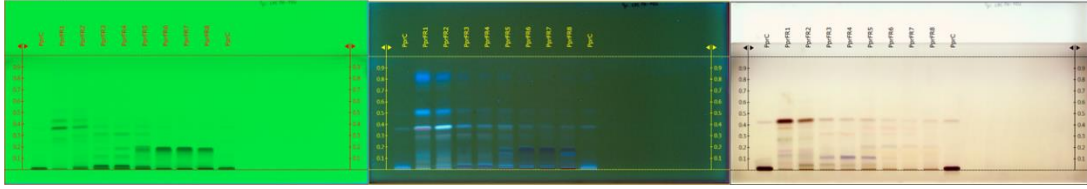
Εικόνα 184. PPAC-P04 (EtOAc:MeOH:H2O:FA 50:10:7:1)-κλάσματα 37-49 (Κωδικός CPC 66-95)



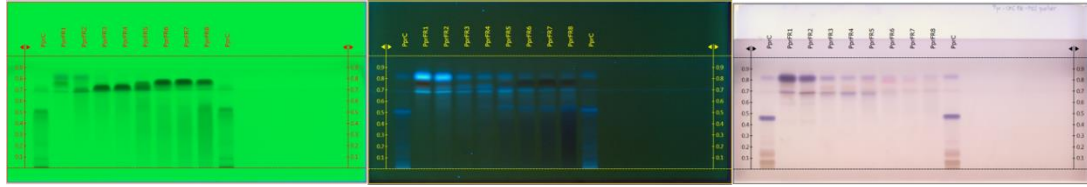
Εικόνα 185. PPAC-P05 (EtOAc:MeOH:H2O:FA 50:10:7:1)-κλάσματα 50-60 (Κωδικός CPC 96-134)

- ❖ Υδατομεθανολικό εκχύλισμα ριζών του είδους *Raeonia parnassica* (Κωδικός εκχυλίσματος: PPRC):

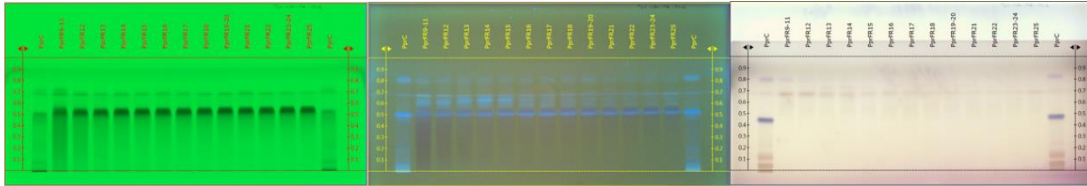
Σε κάθε πλάκα έγινε απόθεση 20 μL από κάθε διάλυμα κλάσματος συγκέντρωσης 1 mg/mL στον κατάλληλο διαλύτη ή μείγμα διαλυτών. Τα συστήματα ανάπτυξης των πλακών επιλέχθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι δυνατή η παρατήρηση του μεγαλύτερου ποσοστού των μεταβολιτών που περιέχονται στο εκάστοτε κλάσμα. Οι ανεπτυγμένες πλάκες παρατηρήθηκαν και φωτογραφήθηκαν στα μήκη κύματος 254 και 366 nm, ενώ μετά τη σάρωση των χρωματογραφημάτων και τη λήψη των φασμάτων απορρόφησης στα μήκη κύματος 200, 254, 280 και 366 nm, πραγματοποιήθηκε η εμβάπτιση των πλακών σε διάλυμα θεικής βανιλίνης. Παρακάτω παρουσιάζονται οι πλάκες TLC των κλασμάτων.



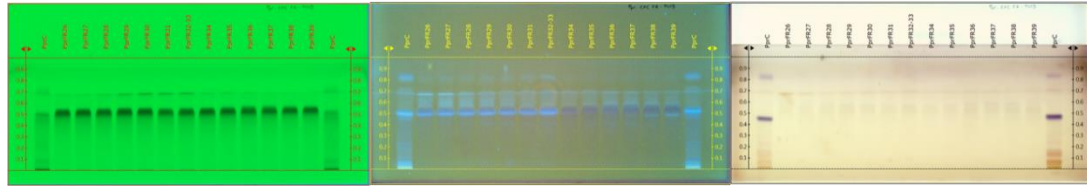
Εικόνα 186. PPRC-P01 (DCM:MeOH 95:5)-κλάσματα 1-8



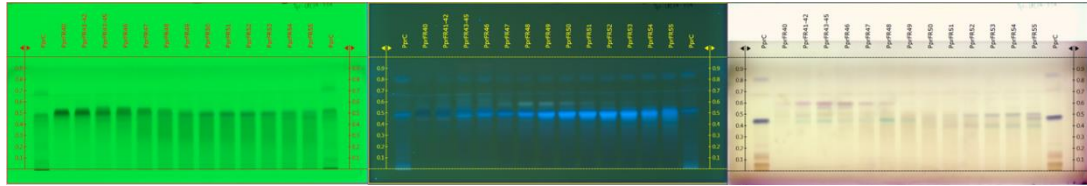
Εικόνα 187. PPRC-P01-polar (EtOAc:MeOH:H₂O:FA 50:10:7:1)-κλάσματα 1-8



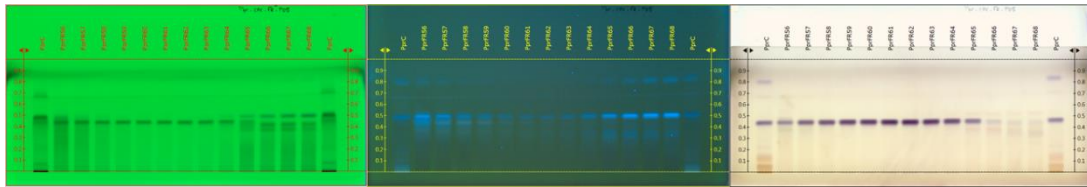
Εικόνα 188. PPRC-P02 (EtOAc:MeOH:H₂O:FA 50:10:7:1)-κλάσματα 9-21 (Κωδικός CPC 9-25)



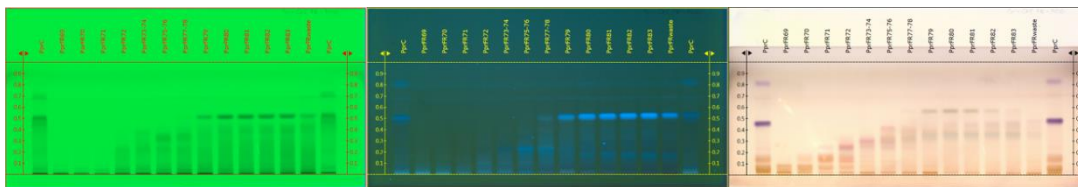
Εικόνα 189. PPRC-P03 (EtOAc:MeOH:H₂O:FA 50:10:7:1)-κλάσματα 22-34 (Κωδικός CPC 26-39)



Εικόνα 190. PPRC-P04 (EtOAc:MeOH:H₂O:FA 50:10:7:1)-κλάσματα 35-47 (Κωδικός CPC 40-55)



Εικόνα 191. PPRC-P05 (EtOAc:MeOH:H₂O:FA 50:10:7:1)-κλάσματα 48-60 (Κωδικός CPC 56-68)



Εικόνα 192. PPRC-P06 (EtOAc:MeOH:H₂O:FA 50:10:7:1)-κλάσματα 61-73 (Κωδικός CPC 69-waste)

Από τη χρωματογραφική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στα παραληφθέντα κλάσματα και των δύο εκχυλισμάτων είναι δυνατόν να διεξαχθούν τα εξής συμπεράσματα: η τεχνική FCPC οδήγησε μία ικανοποιητική κλασμάτωση, παρελήφθησαν απ' ευθείας κάποιες καθαρές ουσίες, ιδιαίτερα στην περίπτωση του εκχυλίσματος PPAC (βλ. κλάσματα PpaFR22-24 και PpaFR30-31). Η ταυτοποίηση των περιεχόμενων ουσιών έγινε εφικτή με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και παρατηρείται μια σταδιακή έκλυση και διακύμανση συστατικών που ανήκουν σε διαφορετικές χημικές κατηγορίες, από τις πιο άπολες προς τις πιο πολικές, μιας και η κινητή φάση που επιλέχθηκε ήταν η οργανική, ενώ στη συνέχεια (μετά την διοχέτευση της στατικής φάσης ως κινητή) λαμβάνει χώρα η ανάκτηση και ο εν μέρει διαχωρισμός των πιο πολικών συστατικών των εκχυλισμάτων.

Ακολούθως στα παραληφθέντα κλάσματα πραγματοποιήθηκε βιολογική αξιολόγηση ως προς την ικανότητα να αναστέλλουν τα ένζυμα AChE και Hyal, λήψη φασμάτων ¹H – NMR και επεξεργασία των δεδομένων που προέκυψαν από αυτά με το στατιστικό εργαλείο HetCA.

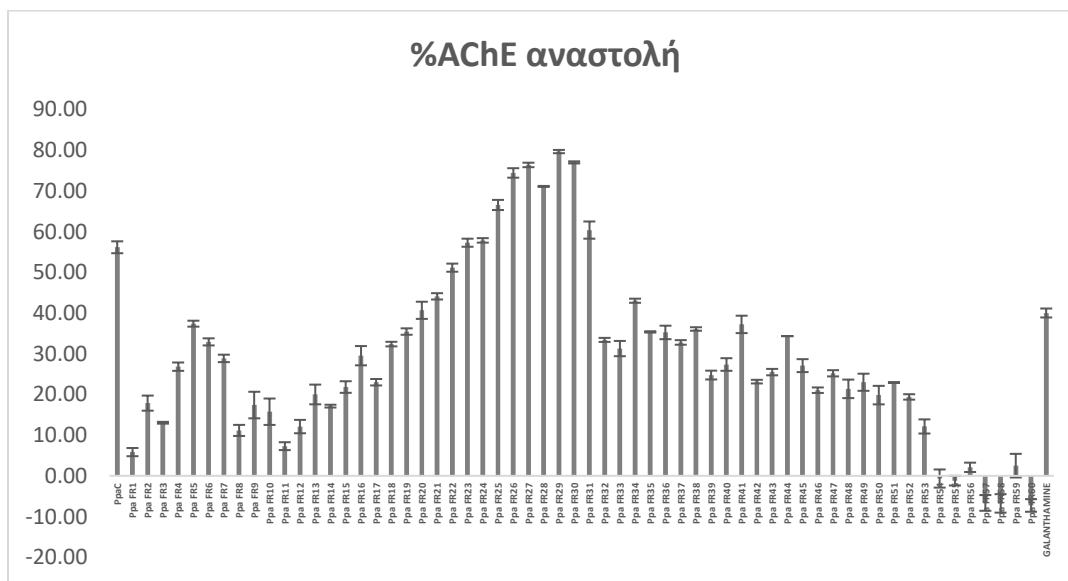
14.3.5 Βιολογική αξιολόγηση των FCPC κλασμάτων

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το δηλητήριο των οφιοειδών περιέχει τοξίνες που είναι υπεύθυνες για τις συστηματικές εκδηλώσεις της δηλητηρίασης, καθώς και ένα σύνολο υδρολυτικών ενζύμων τα οποία προκαλούν ποικίλες αντιδράσεις στον οργανισμό. Η Hyal είναι υπεύθυνη για τη διάσπαση του υαλουρονικού οξέος και τη διάχυση των τοξινών στην κυκλοφορία σε περίπτωση δήγματος. Οι αναστολείς του συγκεκριμένου ενζύμου μπορούν να καθυστερήσουν τη δίοδο των τοξινών στην κυκλοφορία και ως εκ τούτου να επιμηκύνουν το χρόνο επιβίωσης του θύματος. Επιπλέον, αναστολείς της Hyal μπορούν να αξιοποιηθούν στην ανάπτυξη νέων αντιαλλεργικών, αντιφλεγμονωδών, αντικαρκινικών και άλλων φαρμάκων. Επιπρόσθετα, η AChE αποτελεί μια υδρολάση που εντοπίζεται στο δηλητήριο των ειδών της οικογένειας Elapidae κυρίως, ευθύνεται για την αποικοδόμηση του νευροδιαβιβαστή ACh και την επαγόμενη παρεμπόδιση της χολινεργικής διαβίβασης στο Κ.Ν.Σ. του θύματος. Οι αναστολείς της AChE μπορούν να αποτρέψουν τέτοια φαινόμενα, αλλά και να χρησιμεύσουν ως θεραπεία σε νευροεκφυλιστικές νόσους όπως η AD. Με αφετηρία λοιπόν το κείμενο των

Θηριακών, όπου παρουσιάζονται αντίδοτα σε δήγματα ερπετών, και εν συνεχεία με βάση τα αξιολογικά αποτελέσματα των αρχικών εκχυλισμάτων της παιώνιας στις βιοδοκιμασίες που υποβλήθηκαν, τα FCPC κλάσματα των εκχυλισμάτων PPAC και PPRC αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητα αναστολής AChE και Hyal με σκοπό την εύρεση των υπεύθυνων βιοδραστικών μεταβολιτών.

- *In vitro* έλεγχος ικανότητας αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης (Μέθοδος Ellman's)
 - ❖ Υδατομεθανολικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων του είδους *Paeonia parnassica* (Κωδικός εκχυλίσματος: PPAC):

Το εκχύλισμα PPAC ελέγχθηκε στα 300 µg/mL και τα κλάσματα (Ppa FR) που προέκυψαν από αυτό στα 75 µg/mL, ως προς την ικανότητα αναστολής της AChE. Ως πρότυπος αναστολέας χρησιμοποιήθηκε η ουσία γαλανταμίνη σε συγκέντρωση 0.5 µg/mL (1.36 µM) με την οποία προκαλείται αναστολή της AChE σε ποσοστό $40.00 \pm 1.1\%$. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω ραβδόγραμμα.



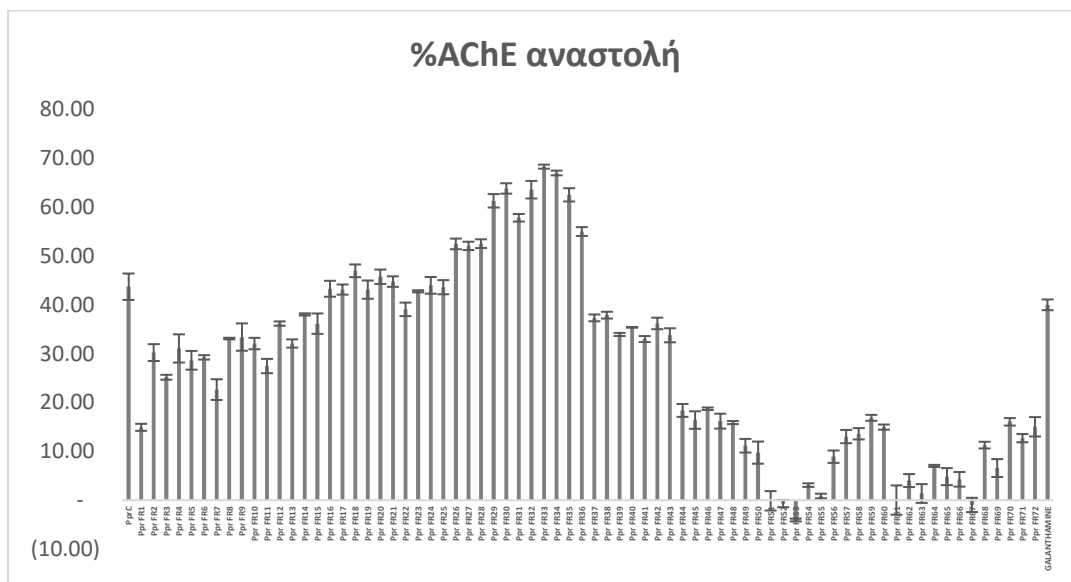
Εικόνα 193. Ραβδόγραμμα %αναστολής της AChE του εκχυλίσματος PPAC (υδατομεθανολικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων της *P. parnassica*) σε συγκέντρωση 300 µg/mL και των FCPC κλασμάτων σε συγκέντρωση 75 µg/mL. Η γαλανταμίνη χρησιμοποιήθηκε ως γνωστός πρότυπος αναστολέας της AChE σε συγκέντρωση 0.5 µg/mL (1.36 µM). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση τριών επαναλήψεων της μέτρησης του δείγματος

Το αρχικό εκχύλισμα PPAC στη συγκέντρωση 300 µg/mL επέδειξε ικανοποιητική αναστολή του ενζύμου με ποσοστό $56.15 \pm 1.46\%$. Τα κλάσματα Ppa FR1 - Ppa FR19 εμφάνισαν χαμηλή ανασταλτική δράση (ποσοστό αναστολής έως 37%) στην τελική συγκέντρωση των 75

μg/mL, ενώ τα κλάσματα Prra FR20 - Prra FR24 προκάλεσαν λίγο μεγαλύτερη αναστολή της AChE (40%-60%) στην ίδια συγκέντρωση. Η πιο αξιοσημείωτη ανασταλτική δράση εντοπίστηκε στα κλάσματα Prra FR25 - Prra FR31 (60%-80%). Ωστόσο η ανασταλτική δράση ελαττώθηκε από τα κλάσματα Prra FR32 - Prra FR41 (30%-40%) και τα κλάσματα Prra FR42 - Prra FR51 (20%-30%), έως τα πιο μη δραστικά κλάσματα Prra FR52 - Prra FR60 (<20%).

- ❖ Υδατομεθανολικό εκχύλισμα ριζών του είδους *Paeonia parnassica* (Κωδικός εκχυλίσματος: PPRC):

Το εκχύλισμα PPRC ελέγχθηκε στα 300 μg/mL και τα κλάσματα (Prr FR) ελέγχθησαν στα 75 μg/mL ως προς την ικανότητα αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE). Ως πρότυπος αναστολέας χρησιμοποιήθηκε η ουσία γαλανταμίνη σε συγκέντρωση 0.5 μg/mL (1.36 μM) (ποσοστό αναστολής της AChE $40.00 \pm 1.1\%$). Τα αποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω ραβδόγραμμα.



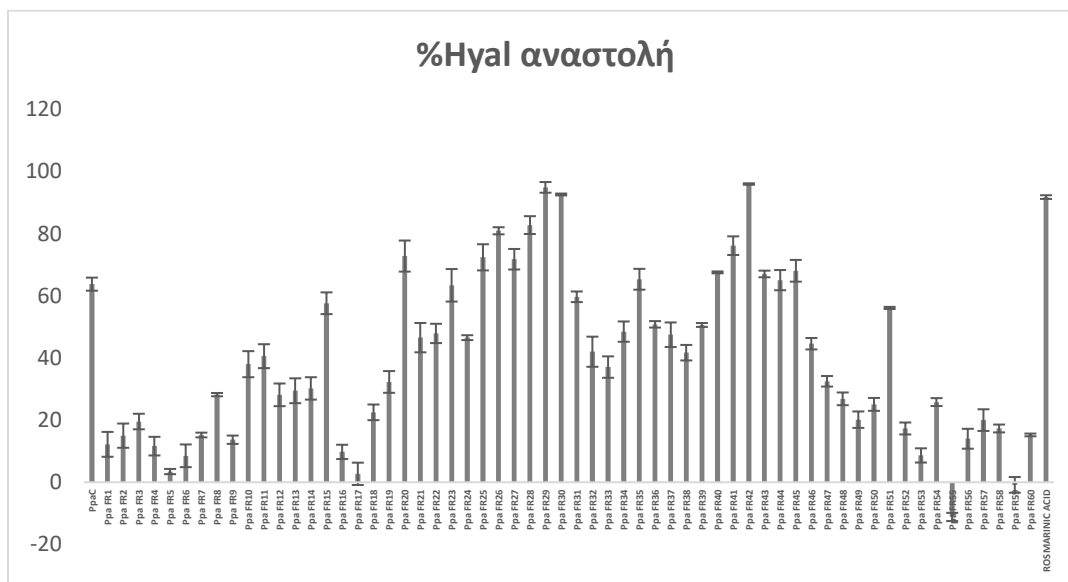
Εικόνα 194. Ραβδόγραμμα %αναστολής της AChE του εκχυλίσματος PPRC (υδατομεθανολικό εκχύλισμα ριζών της *P. parnassica*) σε συγκέντρωση 300 μg/mL και των FCPC κλασμάτων σε συγκέντρωση 75 μg/mL. Η γαλανταμίνη χρησιμοποιήθηκε ως γνωστός πρότυπος αναστολέας της AChE σε συγκέντρωση 0.5 μg/mL (1.36 μM). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση τριών επαναλήψεων της μέτρησης του δείγματος.

Το αρχικό εκχύλισμα PPRC επέδειξε αναστολή $43.71 \pm 2.7\%$ της AChE σε τελική συγκέντρωση 300 μg/mL. Τα κλάσματα Prr FR1 - Prr FR15 παρουσίασαν μέτρια ικανότητα αναστολής του ενζύμου (ποσοστό αναστολής έως 40%) σε τελική συγκέντρωση 75 μg/mL, ενώ τα κλάσματα Prr FR16 - Prr FR25 προκάλεσαν ισχυρότερη αναστολή της AChE (~43%) στην ίδια

συγκέντρωση. Τα υψηλότερα ποσοστά αναστολής του ενζύμου προήλθαν από τα κλάσματα Ppr FR26 - Ppr FR36 (52%-68%), αν και αυτή η δράση μειώθηκε στα επόμενα κλάσματα Ppr FR37 - Ppr FR43 (~36%), τα οποία ακολουθήθηκαν από τα μη δραστικά κλάσματα Ppr FR44 - Ppr FR72 (έως 15%).

- *In vitro* έλεγχος ικανότητας αναστολής της υαλουρονιδάσης
- ❖ Υδατομεθανολικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων του είδους *Paeonia parnassica* (Κωδικός εκχυλίσματος: PPAC):

Το εκχύλισμα PPAC ελέγχθηκε σε τελική συγκέντρωση 300 µg/mL και τα κλάσματα που προέκυψαν με την τεχνική CPC στα 75 µg/mL, ως προς την ικανότητα αναστολής της Hyal. Ως πρότυπος αναστολέας χρησιμοποιήθηκε η ουσία ροσμαρινικό οξύ σε συγκέντρωση 144.1 µg/mL (400 µM) η οποία προκαλεί $91.79 \pm 0.6\%$ αναστολή του ενζύμου. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω ραβδόγραμμα.



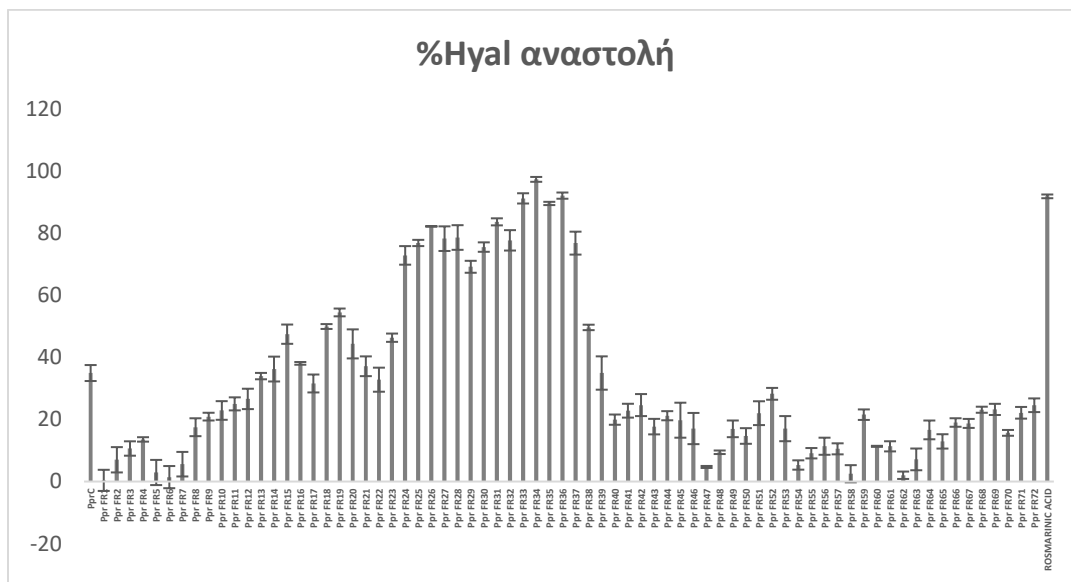
Εικόνα 195. Ραβδόγραμμα %αναστολής της Hyal του εκχυλίσματος PPAC (υδατομεθανολικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων της *P. parnassica*) σε συγκέντρωση 300 µg/mL και των FCPC κλασμάτων σε συγκέντρωση 75 µg/mL. Το ροσμαρινικό οξύ χρησιμοποιήθηκε ως γνωστός πρότυπος αναστολέας της Hyal σε συγκέντρωση 144.1 µg/mL (400 µM). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση τριών επαναλήψεων της μέτρησης του δείγματος.

Το αρχικό εκχύλισμα PPAC σε τελική συγκέντρωση 300 µg/mL επέδειξε αναστολή της Hyal σε ποσοστό $63.76 \pm 2.1\%$. Τα κλάσματα Ppr FR1 - Ppr FR9 δεν εμφάνισαν κάποια σημαντική ανασταλτική δράση (ποσοστά αναστολής έως 20%) στη συγκέντρωση 75 µg/mL, στην οποία δοκιμάστηκαν. Παρ' όλα αυτά τα κλάσματα Ppr FR10 - Ppr FR24 σημείωσαν μέτρια αναστολή

του ενζύμου (~30%-70%), ενώ τα κλάσματα Ppa FR25 - Ppa FR31 προκάλεσαν την ισχυρότερη αναστολή της Hgal (60%-95%). Στα επόμενα κλάσματα, Ppa FR32 - Ppa FR46, τα ποσοστά αναστολής που παρατηρήθηκαν ήταν χαμηλότερα (~40%-60%), ενώ τα κλάσματα Ppa FR47 - Ppa FR60 αποδείχτηκαν τα λιγότερο δραστικά (ποσοστά αναστολής έως 30%).

- ❖ Υδατομεθανολικό εκχύλισμα ριζών του είδους *Paeonia parnassica* (Κωδικός εκχυλίσματος: PPRC):

Το εκχύλισμα PPRC ελέγχθηκε στα 300 µg/mL και τα κλάσματα (Ppr FR) ελέγχθησαν στα 75 µg/mL ως προς την ικανότητα αναστολής της Hgal. Ως πρότυπος αναστολέας χρησιμοποιήθηκε η ουσία ροσμαρινικό οξύ σε συγκέντρωση 144.1 µg/mL (400 µM) και σημείωσε ποσοστό αναστολής του ενζύμου στα $91.79 \pm 0.6\%$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω ραβδόγραμμα.



Εικόνα 196. Ραβδόγραμμα %αναστολής της Hgal του εκχυλίσματος PPRC (υδατομεθανολικό εκχύλισμα ριζών της *P. parnassica*) σε συγκέντρωση 300 µg/mL και των FCPC κλασμάτων του σε συγκέντρωση 75 µg/mL. Το ροσμαρινικό οξύ χρησιμοποιήθηκε ως γνωστός πρότυπος αναστολέας της Hgal σε συγκέντρωση 144.1 µg/mL (400 µM). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση τριών επαναλήψεων της μέτρησης του δείγματος.

Το αρχικό εκχύλισμα PPRC επέδειξε αναστολή της Hgal κατά $34.92 \pm 2.6\%$ στην τελική συγκέντρωση των 300 µg/mL, στην οποία αξιολογήθηκε. Τα κλάσματα Ppr FR1 - Ppr FR14 δεν επέδειξαν αξιοσημείωτη δράση (ποσοστά αναστολής έως 36%) στην τελική συγκέντρωση 75 µg/mL, ενώ τα κλάσματα Ppr FR15 - Ppr FR23 αποδείχτηκαν μέτριοι αναστολείς της Hgal (32%-54%) στην ίδια συγκέντρωση. Η πιο αξιοσημείωτη ανασταλτική δράση εντοπίζεται στα κλάσματα

Ppr FR24 - Ppr FR37 (69%-97%). Στα κλάσματα που ακολουθούν, Ppr FR38 - Ppr FR42, η δράση αυτή μειώνεται (22%-49%), ενώ τα τελευταία κλάσματα Ppr FR43 - Ppr FR72 σημείωσαν τις χαμηλότερες δράσεις αναστολής της Hyal (ποσοστά αναστολής έως 24%).

Παρόλο που τα αποτελέσματα των βιοδοκιμασιών προσέφεραν τις δυνατότητες εντοπισμού των υπεύθυνων για τη δράση κλασμάτων και ποσοτικοποίησης της ικανότητας αναστολής των ενζύμων, εντούτοις δεν ήταν δυνατόν να διεξαχθεί κανένα άλλο συμπέρασμα ως προς το σε ποια κατηγορία ανήκουν και ποιοι συγκεκριμένα είναι οι δραστικοί μεταβολίτες των εκχυλισμάτων. Επιπροσθέτως, είναι πιθανόν η δράση αξιόλογων μεταβολιτών οι οποίοι βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες μέσα σε ένα κλάσμα να υπερκαλύπτεται από τους κύριους μη δραστικούς μεταβολίτες του κλάσματος με τους οποίους συνυπάρχουν. Προκειμένου να ξεπεραστούν αυτά τα προβλήματα και να αναπτυχθεί και να καθιερωθεί μια αξιόπιστη και γρήγορη μέθοδος εύρεσης των υπεύθυνων βιοδραστικών μεταβολιτών ενός εκχυλίσματος, προτού γίνει η απομόνωσή τους, πραγματοποιήθηκε η λήψη φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ σε κάθε ένα κλάσμα και των δύο εκχυλισμάτων και εν συνεχεία διερευνήθηκε η άμεση ταυτοποίηση των δραστικών συστατικών μέσω της συσχέτισης των βιολογικών και φασματοσκοπικών δεδομένων με τη χρήση του στατιστικού εργαλείου HetCA.

14.3.6 Ανάλυση φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ των FCPC κλασμάτων

- ❖ Υδατομεθανολικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων του είδους *Paeonia parnassica* (Κωδικός εκχυλίσματος: PPAC):

Παρασκευάστηκαν διαλύματα των 60 FCPC κλασμάτων σε συγκέντρωση 7 mg/mL σε 99.8% δευτεριωμένη μεθανόλη (MeOD), στην οποία υπήρχε εσωτερικό πρότυπο 0.03% τετραμεθυλοσιλανίου (TMS). Εξαιρέσεις αποτελούν τα διαλύματα των κλασμάτων PpaFR15 και PpaFR41, τα οποία παρασκευάστηκαν σε συγκεντρώσεις 5.5 mg/mL και 6.7 mg/mL, λόγω χαμηλών ποσοτήτων, ενώ στα τελευταία κλάσματα PpaFR58, PpaFR59 και PpaFR60, όπου υπήρχαν σάκχαρα, σχηματίστηκαν εναιωρήματα λόγω ανεπαρκούς διαλυτότητας στη μεθανόλη. Ακολούθως αναλύονται τα αποτελέσματα της προσπάθειας εντοπισμού των δευτερογενών μεταβολιτών με τη χρήση των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$.

- Στο κλάσμα PpaFR.1 ανιχνεύεται η παιωνιφλοριγενόνη σε μεγάλο βαθμό καθαρότητας ενώ στο κλάσμα PpaFR.2 ανιχνεύεται η ίδια ουσία σε μικρότερο βαθμό καθαρότητας.

Στο κλάσμα PpaFR.3 ανιχνεύεται μείγμα παιωνιφλοριγενόνης με μια ουσία που φέρει ένα παρα-υποκατεστημένο αρωματικό σύστημα.

- Στα κλάσματα PpaFR.4 και PpaFR.5 ανιχνεύεται μείγμα γαλλικού μεθυλεστέρα με δύο διγαλλοϋλο- παράγωγά του (*παρα-* και *μετα-* διγαλλικοί μεθυλεστέρες). Στα κλάσματα PpaFR.6 (>90%), PpaFR.7 (>99%), PpaFR.8 (>99%), PpaFR.9 (>99%) και PpaFR.10 (>90%) ανιχνεύεται κυρίως γαλλικός μεθυλεστέρας σε ποσοστά καθαρότητας που αναφέρονται στις παρενθέσεις.
- Στα κλάσματα PpaFR.11 και PpaFR.12 υπάρχουν πολύπλοκα μείγματα φαινολικών παραγώγων με φλαβονοειδή.
- Στα κλάσματα PpaFR.13 και PpaFR.14 ανιχνεύεται ο 3-*O*-αραβινοσίδης της καιμπφερόλης με υψηλότερη καθαρότητα στο PpaFR.13.
- Το κλάσμα PpaFR.15 είναι ένα πολύπλοκο μείγμα φαινολικών παραγώγων με φλαβονοειδή.
- Στα κλάσματα PpaFR.16 και PpaFR.17 ανιχνεύεται ο 3-*O*-αραβινοσίδης της κερκετίνης (πιο καθαρός στο FR.17), ενώ στο κλάσμα PpaFR.18 ανιχνεύεται σε μικρότερη καθαρότητα η ίδια ουσία.
- Στο κλάσμα PpaFR.19 ανιχνεύεται μείγμα του 3-*O*-αραβινοσίδη της κερκετίνης με δύο διγαλλοϋλο- παράγωγα που φέρουν ελεύθερα COOH (*παρα-* και *μετα-* διγαλλικά οξέα).
- Τα κλάσματα PpaFR.20 και PpaFR.21 είναι πολύπλοκα μείγματα μέσα στα οποία αρχίζουν να εμφανίζονται γαλλοϋλο- εστέρες της γλυκόζης. Στα κλάσματα PpaFR.22, PpaFR.23, PpaFR.24, PpaFR.25, PpaFR.26, PpaFR.27 και PpaFR.28 ανιχνεύονται γαλλοϋλο- εστέρες της γλυκόζης. Στα κλάσματα PpaFR.29, PpaFR.30, PpaFR.31 ανιχνεύεται ο πενταγαλλικός εστέρας της γλυκόζης (1,2,3,4,6-πεντα-*O*-γαλλοϋλο-β-D-γλυκοκυρανόση) σε υψηλό ποσοστό καθαρότητας.
- Στα κλάσματα PpaFR.32, PpaFR.33, PpaFR.34, PpaFR.35 και PpaFR.36 ανιχνεύονται μείγματα παραγώγων του πενταγαλλικού εστέρα της γλυκόζης με φλαβονοειδή, όπως ο γαλακτοσίδης της κερκετίνης.
- Στο κλάσμα PpaFR.37 ανιχνεύεται ο 3-*O*-νεοεσπεριδοσίδης της καιμπφερόλης σε μικρή καθαρότητα. Στο κλάσμα PpaFR.38 ανιχνεύεται μείγμα νεοεσπεριδοσιδών καιμπφερόλης και κερκετίνης. Στα κλάσματα PpaFR.39 και PpaFR.40 ανιχνεύεται ο 3-*O*-νεοεσπεριδοσίδης της κερκετίνης σε μικρή καθαρότητα.

- Στα κλάσματα PpaFR.41 και PpaFR.42 υπάρχουν μείγματα φλαβονοειδών που φέρουν σάκχαρα.
- Στο κλάσμα PpaFR.43 ανιχνεύεται ο 3-Ο-σοφοροσίδης της σεξανγκουλαρετίνης (8-μεθοξυκαιμπερόλης) σε υψηλό ποσοστό καθαρότητας. Στο κλάσμα PpaFR.44 ανιχνεύεται το μείγμα των 3-Ο-σοφοροσιδών σεξανγκουλαρετίνης και λιμοσιτρίνης. Στα κλάσματα PpaFR.45 και PpaFR.46 ανιχνεύεται ο 3-Ο-σοφοροσίδης της λιμοσιτρίνης σε μικρή καθαρότητα.
- Τα κλάσματα PpaFR.47, PpaFR.48, PpaFR.49, PpaFR.50, PpaFR.51, PpaFR.52 και PpaFR.53 αποτελούν πολύπλοκα μείγματα.
- Στο κλάσμα PpaFR.54 ανιχνεύονται σάκχαρα και κάποιο αρωματικό σύστημα. Στα κλάσματα PpaFR.55 και PpaFR.56 ανιχνεύονται σάκχαρα και γλυκερόλη, ενώ αρχίζουν να εξαφανίζονται οι κορυφές των αρωματικών πρωτονίων.
- Στα κλάσματα PpaFR.57, PpaFR.58, PpaFR.59 και PpaFR.60 ανιχνεύονται σάκχαρα.
- ❖ Υδατομεθανολικό εκχύλισμα ριζών του είδους *Paeonia parnassica* (Κωδικός εκχυλίσματος: PPRC):

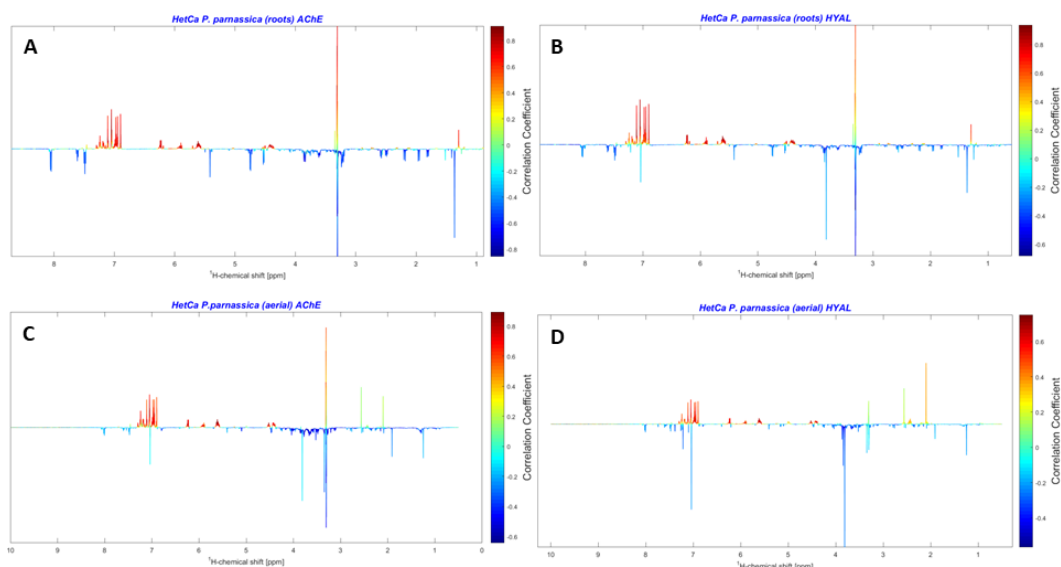
Παρασκευάστηκαν διαλύματα των 73 FCPC κλασμάτων σε συγκέντρωση 7.5 mg/mL σε 99.8% δευτεριωμένη μεθανόλη (MeOD), στην οποία υπήρχε εσωτερικό πρότυπο 0.03% τετραμεθυλοσιλανίου (TMS). Στα τελευταία κλάσματα (PprFR.58 – PprFR.73), όπου υπήρχαν σάκχαρα, σχηματίστηκαν εναιωρήματα λόγω ανεπαρκούς διαλυτότητας στη μεθανόλη. Ακολούθως αναλύονται τα αποτελέσματα της προσπάθειας εντοπισμού των δευτερογενών μεταβολιτών με τη χρήση των φασμάτων ¹H-NMR.

- Στο κλάσμα PprFR.1 ανιχνεύεται η παιωνιφλοριγενόνη.
- Στο κλάσμα PprFR.2 ανιχνεύονται κυρίως η παιωνιφλοριγενόνη αλλά και οι δύο διγαλλικοί μεθυλεστέρες (παρα- και μετα-).
- Στα κλάσματα PprFR.3 και PprFR.4 ανιχνεύονται κυρίως οι δύο προαναφερόμενοι μεθυλεστέρες το διγαλλικού οξέος, μαζί με παιωνιφλοριγενόνη σε πολύ μικρότερο ποσοστό.
- Στα κλάσματα PprFR.5, PprFR.6, PprFR.7 και PprFR.8 ανιχνεύεται ο γαλλικός μεθυλεστέρας με συνεχώς αυξανόμενη καθαρότητα, η οποία φτάνει πάνω από 99% στο κλάσμα PprFR.7, ενώ αρχίζει να ελαττώνεται από το κλάσμα PprFR.8 (>90%).

- Στο κλάσμα PprFR.9 ανιχνεύεται μικρό ποσοστό γαλλικού μεθυλεστέρα μαζί με άλλους εστέρες φαινολικών, ενώ το κλάσμα PprFR.10 αποτελεί ένα πολύπλοκο μείγμα.
- Στα κλάσματα PprFR.11, PprFR.12 και PprFR.13 εμφανίζονται γαλλικοί εστέρες της γλυκόζης.
- Το κλάσμα PprFR.14 αποτελεί ένα πολύπλοκο μείγμα φαινολικών, ενώ στα κλάσματα PprFR.15, PprFR.16, PprFR.17, PprFR.18, PprFR.19, PprFR.20, PprFR.21 και PprFR.22 ανιχνεύονται γαλλοϋλο- εστέρες της γλυκόζης.
- Στα κλάσματα PprFR.23, PprFR.24, PprFR.25, PprFR.26 και PprFR.27 ανιχνεύονται γαλλοϋλο- εστέρες της γλυκόζης, μαζί με παράγωγα του διγαλλικού οξέος.
- Στα κλάσματα PprFR.28, PprFR.29, PprFR.30 και PprFR.31 ανιχνεύονται γαλλικοί εστέρες της γλυκόζης και η παιωνιλακτόνη Β.
- Στα κλάσματα PprFR.32, PprFR.33 και PprFR.34 ανιχνεύεται κυρίως ο 1,2,3,4,6- πενταγαλλικός εστέρας της γλυκόζης (1,2,3,4,6-πεντα-Ο-γαλλοϋλο-β-D-γλυκοπυρανόση) αλλά και σε μικρό ποσοστό η παιωνιλακτόνη Β. Στα κλάσματα PprFR.35 και PprFR.36 ταυτοποιείται ο πενταγαλλικός εστέρας της γλυκόζης σε υψηλή καθαρότητα, ενώ στο κλάσμα PprFR.37 εντοπίζεται η ίδια ουσία σε λιγότερο καθαρή μορφή.
- Στο κλάσμα PprFR.38 ανιχνεύεται μείγμα του πενταγαλλικού εστέρα της γλυκόζης και του 1,2,3,4-τετραγαλλικού εστέρα της γλυκόζης. Στο κλάσμα PprFR.39 ανιχνεύεται ο 1,2,3,4-τετραγαλλικός εστέρας της γλυκόζης σε υψηλό ποσοστό καθαρότητας.
- Στα κλάσματα PprFR.40, PprFR.41, PprFR.42, PprFR.43, PprFR.44, PprFR.45 και PprFR.46 εμφανίζεται πολύπλοκο μείγμα.
- Στο κλάσμα PprFR.47 αρχίζει να ξεχωρίζει η παιωνιφλορίνη. Στα κλάσματα PprFR.48, PprFR.49, PprFR.50, PprFR.51 και PprFR.52 εμφανίζεται συνεχώς αυξανόμενης καθαρότητας παιωνιφλορίνη. Στα κλάσματα PprFR.53, PprFR.54, PprFR.55 και PprFR.56 εντοπίζεται η καθαρότερη μορφή της παιωνιφλορίνης.
- Στο κλάσμα PprFR.57 αρχίζει να ξεχωρίζει ένας άλλος μονοτερπενικός γλυκοσίδης διαφορετικός από την παιωνιφλορίνη. Στα κλάσματα PprFR.58, PprFR.59 και PprFR.60 ανιχνεύεται η αλμπιφλορίνη.
- Στα κλάσματα PprFR.61, PprFR.62, PprFR.63, PprFR.64, PprFR.65, PprFR.66, PprFR.67, PprFR.68, PprFR.69, PprFR.70, PprFR.71, PprFR.72 και PprFR.73 ανιχνεύονται κυρίως σάκχαρα.

14.3.7 Μελέτη ετεροδιακύμανσης φασματοσκοπικών δεδομένων και βιοδραστικότητας (HetCA)

Η συσχέτιση των 1D φασματοσκοπικών δεδομένων $^1\text{H-NMR}$ και των ικανοτήτων αναστολής της AChE και της Hyal εξετάστηκε μέσω του ανεπτυγμένου στατιστικού μοντέλου HetCA. Τα συνολικά 1D ψευδοφάσματα $^1\text{H-NMR}$ για τα δύο εκχυλίσματα και τις 2 βιολογικές δράσεις παρουσιάζονται παρακάτω όπου οπτικοποιούνται οι συσχετίσεις των συντονισμών των συνολικών δεδομένων NMR με τις αντίστοιχες τιμές βιοδραστικότητας, παρέχοντας τη δυνατότητα ταυτοποίησης της δομής των υπεύθυνων για τη δράση φυσικών προϊόντων ανά περίπτωση. Και στις τέσσερις περιπτώσεις γίνεται αντιληπτή η συσχέτιση της δραστηριότητας με παράγωγα γαλλοϋλογλυκόζης (κορυφές ψευδοφάσματος σε κόκκινες αποχρώσεις), σε αντίθεση με τα τερπενοειδή παράγωγα τα οποία δε φάνηκε να συνεισφέρουν σημαντικά στη δράση (κορυφές ψευδοφάσματος σε μπλε αποχρώσεις).



Εικόνα 197. 1D ψευδοφάσματα $^1\text{H-NMR}$ ετεροδιακύμανσης βιολογικής δράσης και αντίστοιχων NMR δεδομένων που προκύπτουν μέσω του αλγορίθμου HetCA των: **A.** FCPC κλασμάτων του υδατομεθανολικού εκχυλίσματος των ριζών της *P. parnassica* (PPRC) ενάντια της AChE, **B.** FCPC κλασμάτων του υδατομεθανολικού εκχυλίσματος των ριζών της *P. parnassica* (PPRC) ενάντια της Hyal, **C.** FCPC κλασμάτων του υδατομεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων της *P. parnassica* (PPAC) ενάντια της AChE, **D.** FCPC κλασμάτων του υδατομεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων της *P. parnassica* (PPAC) ενάντια της Hyal.

Ακολούθως, η συσχέτιση των 1D φασματοσκοπικών δεδομένων $^1\text{H-NMR}$ και της βιολογικής δράσης των κλασμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω μιας αυτοματοποιημένης διαδικασίας όπου ο αλγόριθμος HetCA εφαρμοζόταν χρησιμοποιώντας επαναληπτικά κάθε φορά 4 φάσματα με βήμα 2 οδηγώντας έτσι στη δημιουργία μιας σειράς ψευδοφασμάτων για

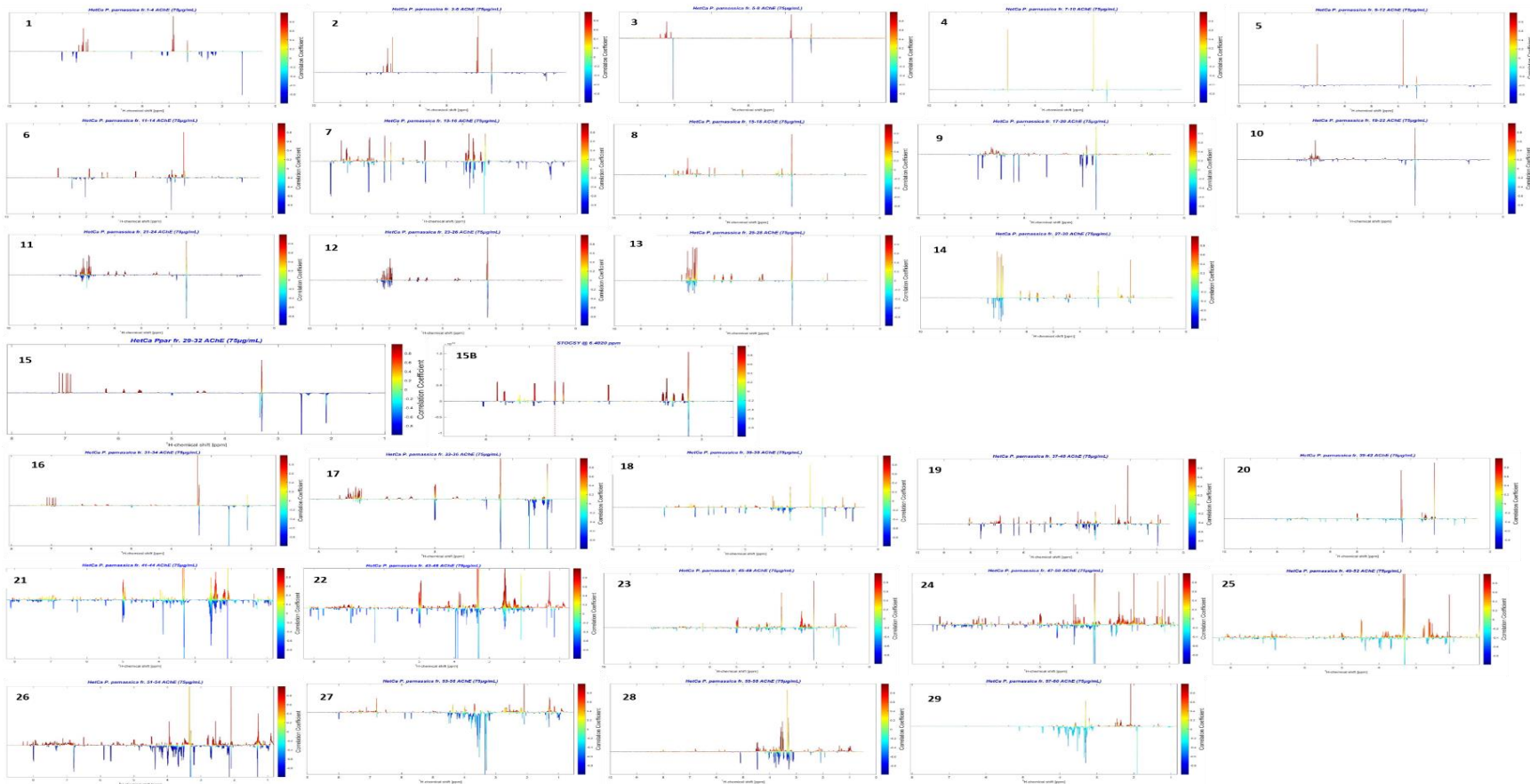
κάθε μια από τις τέσσερις περιπτώσεις. Σε κάθε επανάληψη υπολογιζόταν η συσχέτιση των δεδομένων NMR 4 κλασμάτων και των αντίστοιχων τιμών της δραστηριότητας, ώστε να γίνει δυνατή η δομική αναγνώριση των χαρακτηριστικών των βιοδραστικών συστατικών. Προτού επιλεγεί αυτός ο τρόπος συνδυασμού δεδομένων είχε δοκιμαστεί και η συσχέτιση των 1D φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ επτά διαδοχικών FCPC κλασμάτων και τα βήματα ένα και δύο (π.χ. συσχέτιση κλασμάτων 1-4, 2-5, 3-6 κ.ο.κ. και 1-4, 3-6, 5-8 κ.ο.κ.). Η προσέγγιση που επικράτησε τελικά παρείχε μεγάλη ακρίβεια και συγκέντρωση όσο το δυνατόν περισσότερης πληροφορίας σε σχετικά μικρότερο χρόνο.

- ❖ Υδατομεθανολικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων του είδους *Paeonia parnassica* (Κωδικός εκχυλίσματος: PPAC):

Συνολικά είκοσι εννέα 1D ψευδοφάσματα $^1\text{H-NMR}$ προέκυψαν από τα 60 FCPC κλάσματα του υδατομεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων της *P. parnassica* (PPAC) μετά από συσχετίσεις 1D φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ και ανασταλτικών δράσεων επί της AChE με εφαρμογή του αλγορίθμου HetCA, με αποτέλεσμα την ταυτοποίηση των συστατικών τα οποία συνεισφέρουν περισσότερο στη δράση του αρχικού εκχυλίσματος. Το συνολικό 1D ψευδοφάσμα $^1\text{H-NMR}$ ετεροδιακύμανσης αναστολής της AChE και των αντίστοιχων φασματοσκοπικών δεδομένων όλων των κλασμάτων, το οποίο προκύπτει με εφαρμογή του αλγορίθμου HetCA, παρουσιάζεται στην παραπάνω Εικόνα 197 (C). Όπως γίνεται φανερό τα παράγωγα της γαλλοϋλογλυκόζης αποτελούν τους πιο ισχυρούς αναστολείς της AChE, καθώς παρατηρούνται αρκετές κορυφές στην αρωματική περιοχή του φάσματος και οι επτά χαρακτηριστικές κορυφές της γλυκόζης στην περιοχή χημικών μετατοπίσεων δ 6.25 έως 4.37. Επιπλέον αξίζει να σημειωθεί ότι στο 1D ψευδοφάσμα $^1\text{H-NMR}$ που προκύπτει με εφαρμογή του HetCA αλγορίθμου για τα δεδομένα των κλασμάτων PpaFR.1-PpaFR.4 (Εικόνα 198.1), το μείγμα του γαλλικού μεθυλεστέρα και των δύο διγαλλικών μεθυλεστέρων συσχετίζεται με την αναστολή της AChE καθώς εντοπίζονται δύο ομάδες χαρακτηριστικών κορυφών οι οποίες είναι δ 7.06, 3.83 και δ 7.39, 7.26, 7.23, 7.21, 7.10, 3.86, 3.81. Αντιθέτως η παιωνιφλοριγενόνη φαίνεται να μη συμβάλλει στη δράση, όπως γίνεται αντιληπτό από το ίδιο ψευδοφάσμα και συγκεκριμένα από την παρουσία των χαρακτηριστικών κορυφών του μεταβολίτη, δ 8.04, 7.63, 7.50, 5.43, 4.28, 4.08, 2.88, 2.80, 2.56, 2.42, 2.38, 2.27 και 1.30 σε γαλάζια απόχρωση. Η ίδια εικόνα παρατηρείται και στα επόμενα 1D ψευδοφάσματα $^1\text{H-NMR}$ των κλασμάτων PpaFR.3-PpaFR.6 και PpaFR.5-PpaFR.8, όπου οι διγαλλικοί μεθυλεστέρες φαίνεται να συμβάλλουν περισσότερο στη δράση από το γαλλικό

μεθυλεστέρα (Εικόνα 198.2, Εικόνα 198.3). Στα 1D ψευδοφάσματα $^1\text{H-NMR}$ των κλασμάτων PpaFR.7-PpaFR.10 και PpaFR.9-PpaFR.12 (Εικόνα 198.4, Εικόνα 198.5) γίνεται αντιληπτή η μερική συμβολή του γαλλικού μεθυλεστέρα στη δράση. Στο 1D ψευδοφάσμα $^1\text{H-NMR}$ των κλασμάτων PpaFR.11-PpaFR.14 (Εικόνα 198.6) αναδεικνύεται η συνεισφορά του 3-*O*-αραβινοσίδη της καιμπφερόλης (δ 8.08, 6.91, 6.43, 6.23, 5.17, 3.91-3.42) στην αντιχολινεστερασική δράση. Στο 1D ψευδοφάσματα $^1\text{H-NMR}$ των κλασμάτων PpaFR.13-PpaFR.16 (Εικόνα 198.7) φαίνεται ότι ο 3-*O*-αραβινοσίδης της κερκετίνης (δ 7.74, 7.58, 6.87, 6.40, 6.21, 5.16, 3.90-3.44) συνεισφέρει περισσότερο στη δράση από τον 3-*O*-αραβινοσίδη της καιμπφερόλης, ενώ στο ψευδοφάσμα των κλασμάτων PpaFR.15-PpaFR.18 (Εικόνα 198.8) φαίνεται η αρνητική συσχέτιση του 3-*O*-αραβινοσίδη της καιμπφερόλης, η μερικώς θετική συσχέτιση του 3-*O*-αραβινοσίδη της κερκετίνης και η θετική συσχέτιση των δύο διγαλλικών οξέων (δ 7.40, 7.26, 7.23, 7.22, 7.11). Στα 1D ψευδοφάσματα $^1\text{H-NMR}$ των κλασμάτων PpaFR.17-PpaFR.20, PpaFR.19-PpaFR.22, PpaFR.21-PpaFR.24 και PpaFR.23-PpaFR.26 (Εικόνα 198.9, Εικόνα 198.10, Εικόνα 198.11, Εικόνα 198.12) είναι εμφανές ότι οι γαλλοϋλο-εστέρες της γλυκόζης²⁹⁰ συνεισφέρουν περισσότερο στην αναστολή της AChE. Στα 1D ψευδοφάσματα $^1\text{H-NMR}$ των κλασμάτων PpaFR.25-PpaFR.28 και PpaFR.27-PpaFR.30 (Εικόνα 198.13, Εικόνα 198.14) αρχίζει να ξεχωρίζει η δομή της 1,2,3,4,6-πενταγαλλικής γλυκόζης, ενώ στα ψευδοφάσματα των κλασμάτων PpaFR.29-PpaFR.32 και PpaFR.31-PpaFR.34 (Εικόνα 198.15, Εικόνα 198.16) ταυτοποιείται η συγκεκριμένη ουσία. Επιπλέον στο 1D ψευδοφάσμα $^1\text{H-NMR}$ συσχέτισης με κορυφή ενδιαφέροντος στα 6.4020 ppm των δεδομένων NMR των κλασμάτων PpaFR.29-PpaFR.32, μέσω του αλγόριθμου STOCSY, εντοπίζεται ο 3-*O*-γαλακτοσίδης της κερκετίνης με σχετική συνεισφορά στη δράση (δ 7.71, 7.59, 6.87, 6.40, 6.21, 5.25, 3.76-3.41) (Εικόνα 198.15B). Οι αρνητικές συσχετίσεις του 3-*O*-νεοεσπεριδοσίδη της καιμπφερόλης (δ 8.05, 6.89, 6.38, 6.18, 5.74, 5.22, 4.00-3.42, 0.93), του 3-*O*-νεοεσπεριδοσίδη της κερκετίνης (δ 7.62, 7.60, 6.86, 6.38, 6.18, 5.74, 5.22, 4.00-3.42, 0.93), του 3-*O*-σοφοροσίδη της 8-μεθοξυ-καιμπφερόλης (δ 8.08, 6.97, 6.26, 5.73, 4.67, 3.86, 5.50-2.75), του 3-*O*-σοφοροσίδη της λιμοσιτρίνης (δ 7.91, 7.76, 6.97, 6.29, 5.64, 4.80, 3.99, 3.93, 5.60-2.70) φαίνονται στα 1D ψευδοφάσματα $^1\text{H-NMR}$ των κλασμάτων PpaFR.35-PpaFR.38, PpaFR.37-PpaFR.40, PpaFR.39-PpaFR.42, PpaFR.41-PpaFR.44 και PpaFR.43-PpaFR.46 (Εικόνα 198.18, Εικόνα 198.19, Εικόνα 198.20, Εικόνα 198.21, Εικόνα 198.22). Στα υπόλοιπα 1D ψευδοφάσματα $^1\text{H-NMR}$ συσχέτισης βιοδραστικότητας και δεδομένων NMR των κλασμάτων PpaFR.45-PpaFR.48, PpaFR.47-PpaFR.50, PpaFR.49-PpaFR.52, PpaFR.51-PpaFR.54, PpaFR.53-PpaFR.56, PpaFR.55-PpaFR.58 και PpaFR.57-PpaFR.60 (Εικόνα 198.23, Εικόνα 198.24, Εικόνα 198.25, Εικόνα 198.26,

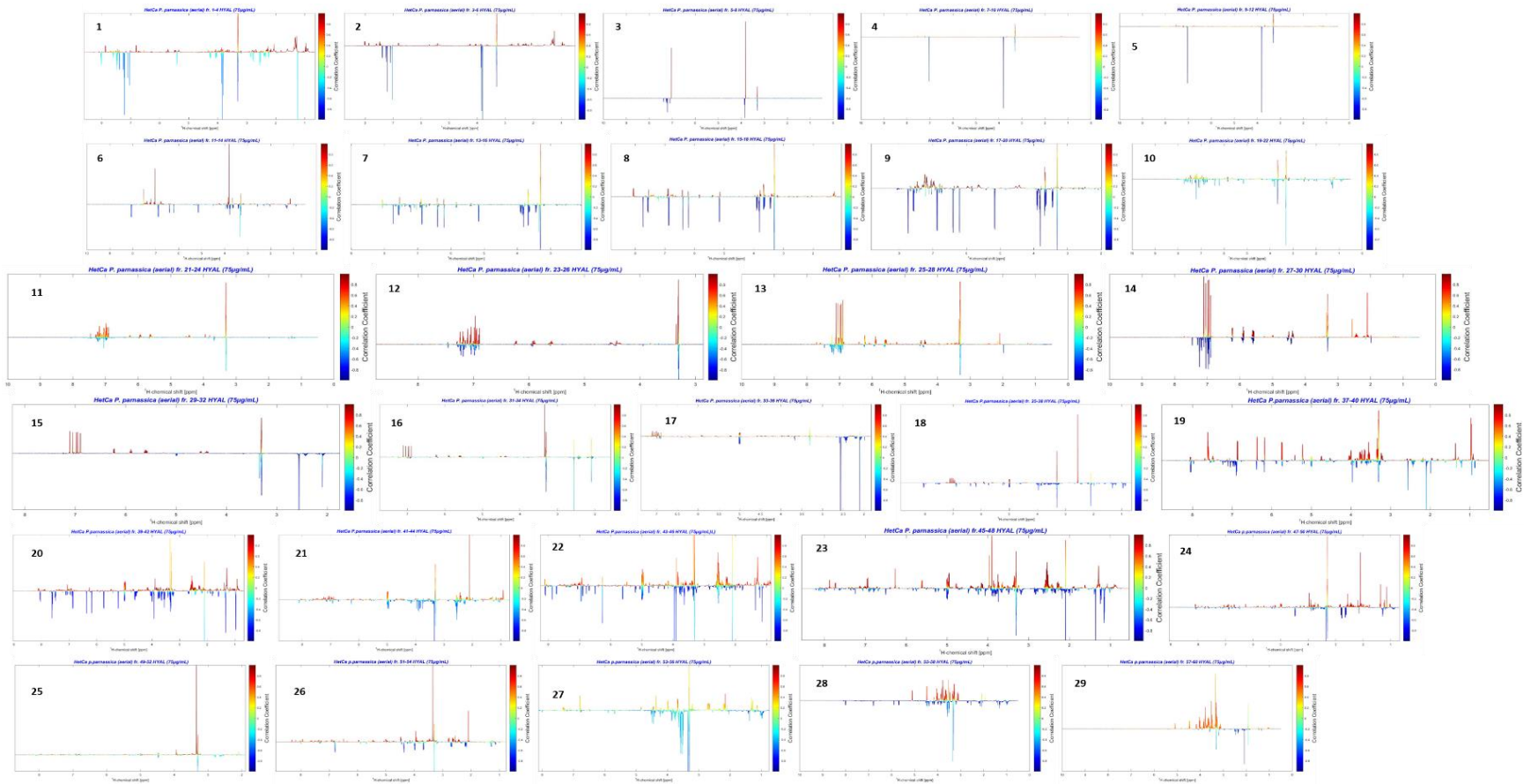
Εικόνα 198.27, Εικόνα 198.28, Εικόνα 198.29) που προκύπτουν με εφαρμογή του αλγορίθμου HetCA δεν εντοπίζονται ενδιαφέρουσες θετικές συσχετίσεις λόγω της παρουσίας σακχάρων.



Εικόνα 198. 1D ψευδοφάσματα $^1\text{H-NMR}$ ετεροδιακύμανσης βιοδραστηκότητας ενάντια της AChE και δεδομένων NMR των FCPC κλασμάτων του υδατομεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων της *P. rarnassica* όπως προκύπτουν με εφαρμογή του αλγορίθμου HetCA

Στην περίπτωση της υαλουρονιδάσης είκοσι εννέα 1D ψευδοφάσματα $^1\text{H-NMR}$ ετεροδιακύμανσης της βιολογικής δράσης και των δεδομένων NMR προέκυψαν από τα 60 συνολικά FCPC κλάσματα του υδατομεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων της *P. parnassica* (PPAC), με εφαρμογή του αλγορίθμου HetCA. Το συνολικό 1D ψευδοφάσμα $^1\text{H-NMR}$ ετεροδιακύμανσης αναστολής της Hyal και των αντίστοιχων φασματοσκοπικών δεδομένων όλων των κλασμάτων παρουσιάζεται στην αρχική Εικόνα 197 (D). Πιο συγκεκριμένα στο 1D ψευδοφάσμα $^1\text{H-NMR}$ ετεροδιακύμανσης της βιοδραστικότητας και των δεδομένων NMR των κλασμάτων PpaFR.1-PpaFR.4 τα σήματα που αντιστοιχούν στο γαλλικό μεθυλεστέρα, στους δύο διγαλλικούς μεθυλεστέρες και στην παιωνιφλοριγενόνη δεν παρουσιάζουν συσχέτιση με τη δράση (μπλε περιοχή ψευδοφάσματος) (Εικόνα 199.1). Το ίδιο περίπου παρατηρείται στο επόμενο 1D ψευδοφάσμα $^1\text{H-NMR}$ ετεροδιακύμανσης των δεδομένων των κλασμάτων PpaFR.3-PpaFR.6, με τη διαφορά ότι η παιωνιφλοριγενόνη φαίνεται να έχει μια σχετική μικρή δράση (Εικόνα 199.2). Στα 1D ψευδοφάσματα $^1\text{H-NMR}$ ετεροδιακύμανσης των κλασμάτων PpaFR.5-PpaFR.8, PpaFR.7-PpaFR.10 και PpaFR.9-PpaFR.12 (Εικόνα 199.3, Εικόνα 199.4, Εικόνα 199.5) επιβεβαιώνεται η ελάχιστη έως ανύπαρκτη συνεισφορά του γαλλικού μεθυλεστέρα και η μη συνεισφορά των διγαλλικών μεθυλεστέρων στη δράση. Στα 1D ψευδοφάσματα $^1\text{H-NMR}$ ετεροδιακύμανσης της βιοδραστικότητας και των δεδομένων NMR των κλασμάτων PpaFR.19-PpaFR.22, PpaFR.21-PpaFR.24, PpaFR.23-PpaFR.26, PpaFR.25-PpaFR.28 και PpaFR.27-PpaFR.30 (Εικόνα 199.10, Εικόνα 199.11, Εικόνα 199.12, Εικόνα 199.13, Εικόνα 199.14) που προκύπτουν με εφαρμογή του αλγορίθμου HetCA, οι κορυφές που αντιστοιχούν στα γαλλοϋλο- παράγωγα της γλυκόζης και ειδικότερα στα παράγωγα της 1,2,3,4,6-πενταγαλλικής γλυκόζης επιδεικνύουν ισχυρή συσχέτιση με την ικανότητα αναστολής της Hyal, ενώ σε καθαρή μορφή η ουσία εμφανίζεται στα ψευδοφάσματα των κλασμάτων PpaFR.29-PpaFR.32 και PpaFR.31-PpaFR.34 (Εικόνα 199.15, Εικόνα 199.16), όπως συναίβει και στην περίπτωση της AChE. Η απουσία συνεισφοράς στη δράση από τη μεριά των 3-Ο-γλυκοσυλιωμένων φλαβονοειδών, όπως του 3-Ο-αραβινοσίδη της καιμπφερόλης, του 3-Ο-αραβινοσίδη της κερκετίνης, του 3-Ο-νεοεσπεριδοσίδη της καιμπφερόλης, του 3-Ο-νεοεσπεριδοσίδη της κερκετίνης, του 3-Ο-σοφοροσίδη της 8-μεθοξυ-καιμπφερόλης και του 3-Ο-σοφοροσίδη της λιμοσιτρίνης, γίνεται φανερό στα 1D ψευδοφάσματα $^1\text{H-NMR}$ ετεροδιακύμανσης της ικανότητας αναστολής της Hyal και των NMR δεδομένων των κλασμάτων PpaFR.11-PpaFR.14, PpaFR.13-PpaFR.16, PpaFR.15-PpaFR.18, PpaFR.17-PpaFR.20, PpaFR.35-PpaFR.38, PpaFR.39-PpaFR.42, PpaFR.41-PpaFR.44 και PpaFR.43-PpaFR.46 (Εικόνα 199.6, Εικόνα 199.7, Εικόνα 199.8, Εικόνα 199.9, Εικόνα 199.18,

Εικόνα 199.20, Εικόνα 199.21, Εικόνα 199.22) όπως προκύπτουν από την εφαρμογή του HetCA αλγορίθμου. Σημειώνεται επιπλέον η θετική συσχέτιση των κορυφών που αντιστοιχούν στα διγαλλικά οξέα με την ικανότητα αναστολής της ΗγαI, όπως παρουσιάζεται στο 1D ψευδοφάσμα $^1\text{H-NMR}$ των κλασμάτων PpaFR.17-PpaFR.20 (Εικόνα 199.9). Στα HetCA ψευδοφάσματα $^1\text{H-NMR}$ των κλασμάτων PpaFR.45-PpaFR.48, PpaFR.47-PpaFR.50, PpaFR.49-PpaFR.52, PpaFR.51-PpaFR.54, PpaFR.53-PpaFR.56, PpaFR.55-PpaFR.58 και PpaFR.57-PpaFR.60 (Εικόνα 199.23, Εικόνα 199.24, Εικόνα 199.25, Εικόνα 199.26, Εικόνα 199.27, Εικόνα 199.28, Εικόνα 199.29) δεν εντοπίζεται κάποια ενδιαφέρουσα θετική συσχέτιση και είναι εμφανής η παρουσία σακχάρων.

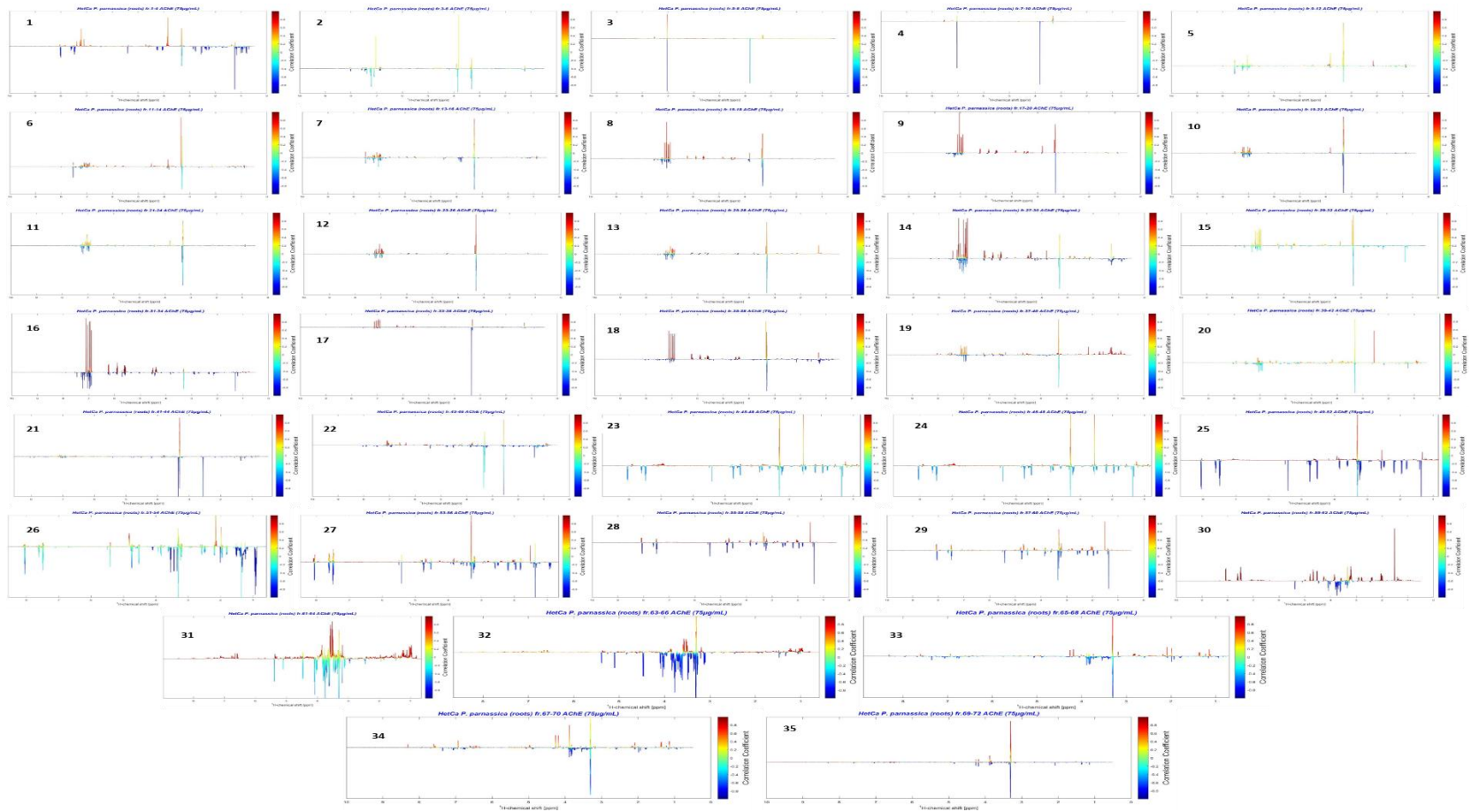


Εικόνα 199. 1D ψευδοφάσματα $^1\text{H-NMR}$ ετεροδιακύμανσης βιοδραστικότητας ενάντια της *Hyal* και δεδομένων NMR των FCPC κλασμάτων του υδατομεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων της *P. ramnassica* όπως προκύπτουν με εφαρμογή του αλγορίθμου *HetCA*

- ❖ Υδατομεθανολικό εκχύλισμα ριζών του είδους *Paeonia parnassica* (Κωδικός εκχυλίσματος: PPRC):

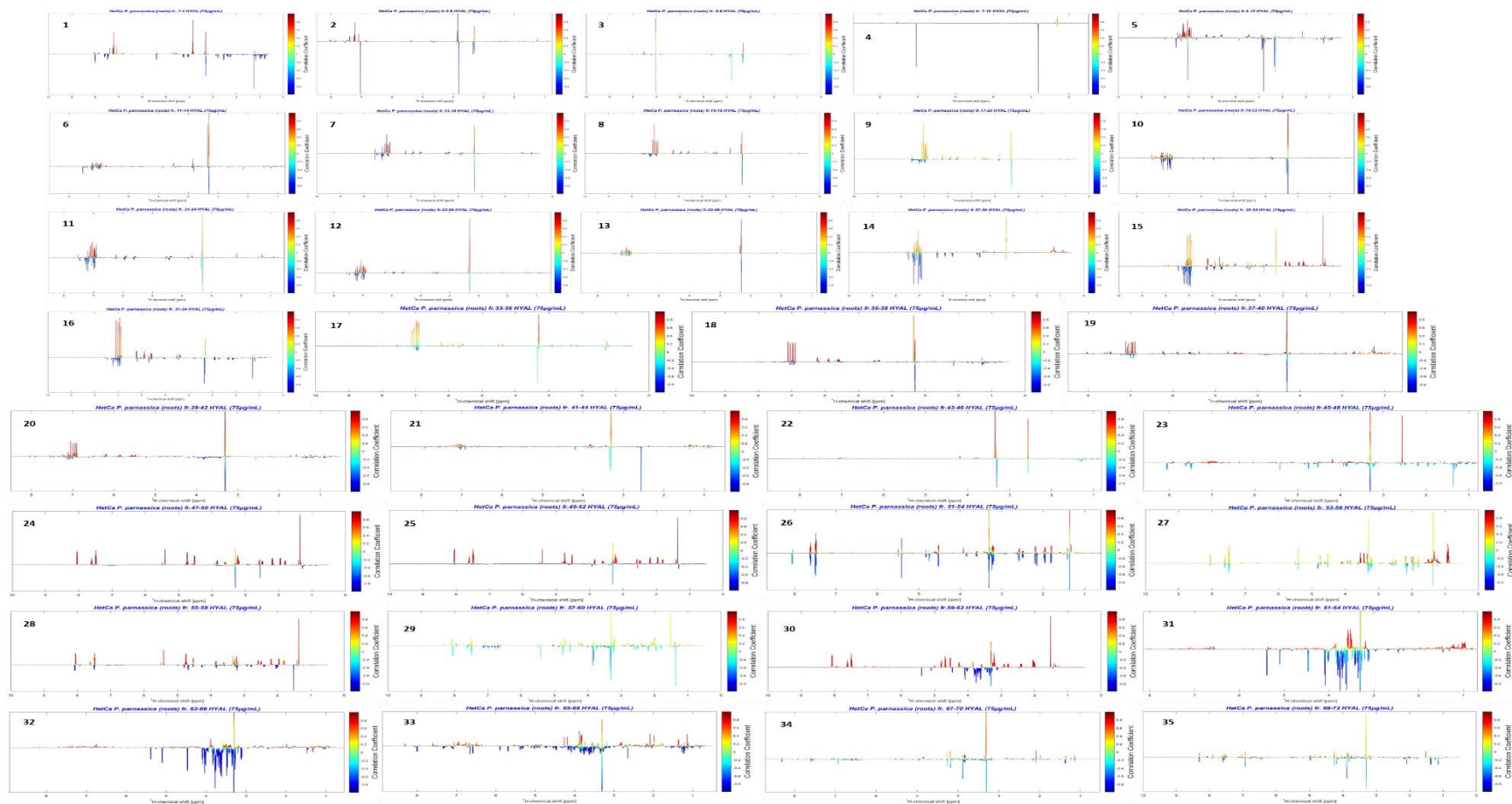
Τριάντα πέντε 1D ψευδοφάσματα $^1\text{H-NMR}$ ετεροδιακύμανσης της ικανότητας αναστολής της AChE και των NMR δεδομένων των 72 FCPC κλασμάτων του υδατομεθανολικού εκχυλίσματος των ριζών της *P. parnassica* (PPRC), κατέστησαν δυνατή την ανίχνευση των υπεύθυνων βιοδραστικών συστατικών του εκχυλίσματος. Το συνολικό 1D ψευδοφάσμα $^1\text{H-NMR}$ ετεροδιακύμανσης αναστολής της AChE και των αντίστοιχων φασματοσκοπικών δεδομένων όλων των κλασμάτων, το οποίο προκύπτει με εφαρμογή του αλγορίθμου HetCA για το συγκεκριμένο εκχύλισμα, παρουσιάζεται στην αρχική εικόνα Εικόνα 197 (A). Σε αυτό αναδεικνύεται η σημαντική συνεισφορά των γαλλοϋλο-εστέρων της γλυκόζης στην αναστολή της AChE, με βάση την παρουσία των χαρακτηριστικών κορυφών των παραγώγων αυτής της κατηγορίας σε χημικές μετατοπίσεις δ 6.25 έως 4.37 όπου βρίσκονται τα πρωτόνια της γλυκόζης και στην αρωματική περιοχή του ψευδοφάσματος. Όσον αφορά τα επιμέρους 1D ψευδοφάσματα $^1\text{H-NMR}$ ετεροδιακύμανσης βιολογικής δραστηριότητας και δεδομένων NMR των κλασμάτων, τα οποία επεξεργάστηκαν σε ομάδες των τεσσάρων με εφαρμογή του HetCA αλγορίθμου, τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 200. Στο 1D ψευδοφάσμα $^1\text{H-NMR}$ ετεροδιακύμανσης των δεδομένων των κλασμάτων PprFR.1-PprFR.4 (Εικόνα 200.1) το μέγιστο της δράσης φαίνεται να συμπίπτει με το μέγιστο των δύο ομάδων κορυφών στις χημικές μετατοπίσεις δ 7.06, 3.83 και δ 7.39, 7.26, 7.23, 7.21, 7.10, 3.86, 3.81, οι οποίες αντιστοιχούν στο μείγμα γαλλικού μεθυλεστέρα και των δύο διγαλλικών μεθυλεστέρων, αντιστοίχως. Στο ίδιο ψευδοφάσμα γίνεται φανερό ότι τα σήματα που παρατηρούνται στις μετατοπίσεις δ 8.04, 7.63, 7.50, 5.43, 4.28, 4.08, 2.88, 2.80, 2.56, 2.42, 2.38, 2.27 και 1.30 και ανήκουν στο μόριο της παιωνιφλοριγενόνης δεν παρουσιάζουν συσχέτιση με την ικανότητα αναστολής της AChE για την ομάδα κλασμάτων PprFR.1-PprFR.4. Στα επόμενα HetCA 1D ψευδοφάσματα $^1\text{H-NMR}$ των κλασμάτων PprFR.3-PprFR.6, PprFR.5-PprFR.8 και PprFR.7-PprFR.10 (Εικόνα 200.2, Εικόνα 200.3, Εικόνα 200.4) επιβεβαιώνεται η μη συνεισφορά της παιωνιφλοριγενόνης, η μέτρια έως μηδενική συνεισφορά του γαλλικού μεθυλεστέρα και η συνεισφορά των δύο διγαλλικών μεθυλεστέρων στην αναστολή της AChE. Στα 1D ψευδοφάσματα $^1\text{H-NMR}$ ετεροδιακύμανσης των κλασμάτων PprFR.11-PprFR.14, PprFR.13-PprFR.16 και PprFR.15-PprFR.18 (Εικόνα 200.6, Εικόνα 200.7, Εικόνα 200.8) αλλά και στα επόμενα αναδεικνύεται η συνεισφορά των δραστικών γαλλικών εστέρων της γλυκόζης. Στα 1D ψευδοφάσματα $^1\text{H-NMR}$ ετεροδιακύμανσης

βιοδραστικότητας και NMR δεδομένων των κλασμάτων PprFR.23–PprFR.26, PprFR.25–PprFR.28 και PprFR.27–PprFR.30 (Εικόνα 200.12, Εικόνα 200.13, Εικόνα 200.14) οι κορυφές που αντιστοιχούν στα δύο παράγωγα διγαλλικού οξέος παρουσιάζουν συσχέτιση με την ικανότητα αναστολής της AChE. Στα 1D ψευδοφάσματα ¹H-NMR ετεροδιακύμανσης δράσης και δεδομένων NMR των κλασμάτων PprFR.31–PprFR.34, PprFR.33–PprFR.36 και PprFR.35–PprFR.38 (δ 7.13, 7.07, 7.00, 6.97, 6.92, 6.25, 5.92, 5.64, 5.58, 4.51, 4.41, 4.37) (Εικόνα 200.16, Εικόνα 200.17, Εικόνα 200.18) ανιχνεύεται ο πιο ισχυρός αναστολέας της AChE που περιέχεται στο εκχύλισμα PPRC και είναι η 1,2,3,4,6-πενταγαλλική γλυκόζη. Επιπλέον, στο HetCA ψευδοφάσμα των κλασμάτων PprFR.31–PprFR.34 και συγκεκριμένα στη μπλε περιοχή αυτού φανερώνεται η απουσία συσχέτισης της ικανότητας αναστολής της AChE και των κορυφών που εντοπίζονται στις μετατοπίσεις δ 6.19, 5.70, 5.04, 3.70, 2.91, 2.72, 2.32, 2.12, 1.30 και αναλογούν στο μόριο της παιωνιλακτόνης Β. Οι κορυφές που αντιστοιχούν στην παιωνιφλορίνη, η οποία αποτελεί τον πιο χαρακτηριστικό μεταβολίτη του γένους *Paeonia*, παρατηρούνται στην αρνητική περιοχή των HetCA 1D ψευδοφασμάτων ¹H-NMR των κλασμάτων PprFR.45–PprFR.48, PprFR.47–PprFR.50, PprFR.49–PprFR.52 (δ 8.05, 7.61, 7.49, 5.42, 4.75, 4.53, 3.85, 3.61, 3.24–3.19, 2.58, 2.49, 2.19, 1.95, 1.81, 1.35) (Εικόνα 200.23, Εικόνα 200.24, Εικόνα 200.25). Αυτό σημαίνει ότι δεν υπάρχει κάποια συσχέτιση ανάμεσα στην παιωνιφλορίνη και στην ικανότητα αναστολής της AChE, την οποία επέδειξε το αρχικό εκχύλισμα, κάτι το οποίο παρατηρήθηκε και με το μη γλυκοζυλιωμένο παράγωγο της, την παιωνιφλοριγενόνη. Τέλος στα 1D ψευδοφάσματα ¹H-NMR ετεροδιακύμανσης της δράσης και των NMR δεδομένων των κλασμάτων PprFR.51–PprFR.54, PprFR.53–PprFR.56, PprFR.55–PprFR.58, PprFR.57–PprFR.60 και PprFR.59–PprFR.62 (Εικόνα 200.26, Εικόνα 200.27, Εικόνα 200.28, Εικόνα 200.29, Εικόνα 200.30) αναδεικνύεται η πιθανή θετική συσχέτιση δράσης και των κορυφών στις μετατοπίσεις δ 8.07, 7.61, 7.49, 4.79, 4.66, 4.52, 4.26, 3.84, 3.62, 3.21, 2.91, 2.79, 2.40, 2.04, 2.02, 1.51 που αντιστοιχούν στο μόριο της αλπιφλορίνης



Εικόνα 200. 1D ψευδοφάσματα $^1\text{H-NMR}$ ετεροδιακύμανσης βιοδραστικότητας ενάντια της AChE και NMR δεδομένων των FCPC κλασμάτων του υδατομεθανολικού εκχυλίσματος των ριζών της *P. parnassica* όπως προκύπτουν με εφαρμογή του αλγορίθμου HetCA

Στην περίπτωση της υαλουρονιδάσης, τριάντα πέντε 1D ψευδοφάσματα $^1\text{H-NMR}$ ετεροδιακύμανσης της ικανότητας αναστολής της Hyal και των NMR δεδομένων των 72 FCPC κλασμάτων του υδατομεθανολικού εκχυλίσματος των ριζών του είδους *P. parnassica* (PPRC) προέκυψαν με εφαρμογή του αλγορίθμου HetCA. Μέσω αυτής της προσέγγισης έγινε δυνατή η ανίχνευση των βιοδραστικών δευτερογενών μεταβολιτών οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τη δραστηριότητα που εμφάνισε το αρχικό εκχύλισμα στη δοκιμασία αναστολής της Hyal, προτού πραγματοποιηθεί η παραλαβή και η ταυτοποίηση τους. Το συνολικό HetCA 1D ψευδοφάσμα $^1\text{H-NMR}$ ετεροδιακύμανσης της βιολογικής δράσης και των φασματοσκοπικών δεδομένων όλων των κλασμάτων του εκχυλίσματος παρουσιάζεται στην αρχική εικόνα Εικόνα 197 (B). Σε αυτό γίνεται φανερό ότι τα παράγωγα του πενταγαλλικού εστέρα της γλυκόζης αποτελούν τους πιο ισχυρούς αναστολείς της Hyal του εκχυλίσματος. Επιπροσθέτως, τα επιμέρους HetCA 1D ψευδοφάσματα $^1\text{H-NMR}$ των κλασμάτων που προήλθαν από ομαδοποίηση των δεδομένων (ομάδες των τεσσάρων) παρουσίασαν σε μεγάλο βαθμό ομοιότητα με τα αντίστοιχα που προέκυψαν στην περίπτωση της AChE και αναλύθηκαν παραπάνω. Συνεπώς φαίνεται πως τα ίδια συστατικά του εκχυλίσματος είναι υπεύθυνα και για την ικανότητα αναστολής της Hyal. Τα 1D ψευδοφάσματα $^1\text{H-NMR}$ ετεροδιακύμανσης βιολογικής δράσης και NMR δεδομένων, όλων των FCPC κλασμάτων του εκχυλίσματος που προκύπτουν με εφαρμογή του αλγορίθμου HetCA, φαίνονται στην Εικόνα 201, ενώ ενδεικτικά επισημαίνονται τα HetCA ψευδοφάσματα των κλασμάτων PprFR.1-PprFR.4, PprFR.15-PprFR.18, PprFR.31-PprFR.734 και PprFR.45-PprFR.48 (Εικόνα 201.1, Εικόνα 201.8, Εικόνα 201.16, Εικόνα 201.23), τα οποία είναι σχεδόν πανομοιότυπα με αυτά που προέκυψαν στην περίπτωση της AChE και αποκαλύπτουν ότι οι ίδιες κορυφές που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένους μεταβολίτες εμφανίζουν ή όχι συσχέτιση με τη δράση. Σημειώνεται τέλος η ανάδειξη της θετικής συνεισφοράς του 1,2,3,4-τετραγαλλικού εστέρα της γλυκόζης στην αναστολή της Hyal, όπως φαίνεται στο 1D ψευδοφάσμα $^1\text{H-NMR}$ ετεροδιακύμανσης δράσης και NMR δεδομένων των κλασμάτων PprFR.39-PprFR.42 (Εικόνα 201.20).



Εικόνα 201. 1D ψευδοφάσματα $^1\text{H-NMR}$ ετεροδιακύμανσης βιοδραστικότητας ενάντια της Hyal και NMR δεδομένων των FCPC κλασμάτων του υδατομεθανολικού εκχυλίσματος των ριζών της $P. parnassica$ όπως προκύπτουν με εφαρμογή του αλγορίθμου HetCA

Efficient identification of Acetylcholinesterase and Hyaluronidase inhibitors from *Paeonia parnassica* extracts through a HeteroCovariance Approach.

Rozalia M¹, Konstantina S¹, Panagiotis P¹, Dimitra B², Emmanuel M², Nektarios A¹.

¹*Department of Pharmacognosy & Natural Products Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Athens, Panepistimiopolis Zografou, 15771 Athens, Greece.*

²*Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Athens, Panepistimiopolis Zografou, 15771 Athens, Greece.*

ABSTRACT

ETHNOPHARMACOLOGICAL RELEVANCE:

On the basis of the relevant reference in the poem Theriaca of the ancient Greek physician Nicander and its traditional use, *Paeonia parnassica* was selected for the evaluation of two extracts obtained from the roots and aerial parts to inhibit hydrolytic enzymes involved in snake envenomation. The secondary metabolites which contribute to these activities were detected through a novel HeteroCovariance NMR based approach. Afterwards these ingredients were isolated, identified and evaluated for their inhibitory potency.

AIM OF THE STUDY:

The identification of acetylcholinesterase and hyaluronidase inhibitors from *Paeonia parnassica* extracts was used as a case study for the introduction of a recently developed methodology to evaluate ethnopharmacological data and exploit them for the discovery of bioactive natural compounds. This process is based on the fractionation of the selected extracts and the simultaneous phytochemical analysis and biological assessment of the resulting fractions, which permits the rapid detection of the specified secondary metabolites prior to any laborious and time-consuming purification.

MATERIALS AND METHODS:

The roots and aerial parts of *P. parnassica* were extracted using methanol:water 50:50 and the two resulted extracts were fractionated by Centrifugal Partition Chromatography. The obtained fractions were evaluated in-vitro for their ability to inhibit acetylcholinesterase and hyaluronidase enzymes and their ¹H-NMR spectra were recorded. The biological activity was statistically correlated with the spectral data through the HeteroCovariance Approach (HetCA). Finally the purification, identification and biological evaluation of targeted secondary metabolites were carried out.

RESULTS:

The general chemical structures and some explicit secondary metabolites which contribute (e.g. gallotannins, gallic acid derivatives) or not (characteristic "cage-like" monoterpenes of the genus, glycosylated flavonoids) to the anti-acetylcholinesterase and anti-hyaluronidase activities were

detected through HetCA. The consequent isolation and biological evaluation of targeted compounds were performed in order to validate the effectiveness and precision of the methodology. This procedure revealed the most active ingredients of both extracts obtained from roots and aerial parts in the above mentioned biological targets, as well as other compounds possessing moderate activity.

CONCLUSIONS:

The results of this study contributed to the verification of the ancient text Theriaca regarding the use of *Paeonia parnassica* to treat the snake bite symptoms. Furthermore, the ingredients of the *Paeonia parnassica* extracts, which were responsible for their anticholinesterase and anti-hyaluronidase activities, were determined applying a HetCA methodology before their isolation. Therefore, the current work provides clear evidence that HetCA could consist an efficient tool for the exploitation of traditional medicine information in order to discover bioactive natural compounds and develop new pharmacotherapies which serve the needs of contemporary medicine.

Planta Medica

Bio-guided isolation of new natural anti-venom agents from extracts reported on the work of the ancient Greek physician, Nicander

R Michalea, V Boznou, V Dedousi, E Kalpoutzakis, P Polychronopoulos, N Aligiannis

Department of Pharmacognosy and Natural Products Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Athens, Athens, Greece

Nicander was a famous poet-naturalist of the 2nd century BC. Theriaca is his second surviving work, a Hellenistic poem, on the bites of venomous creatures, while a series of herbal remedies are also mentioned. The aim of this study was to evaluate the chemical content and biological properties of plants reported on Theriaca and in particular to investigate the possibility of their application as therapeutic agents for wound healing and neurodegenerative diseases. Plants were collected, dried and extracted by Accelerated Solvent Extraction (ASE) technique resulting in the creation of a 'theriaca extracts' library. Their chemical profile was analyzed by HPTLC and LC-MS. The anti-venom potent of the most promising extracts was evaluated by enzymatic inhibitory assays. Hyaluronidase, phospholipase-A2 and acetylcholinesterase [1] are common molecular targets for the evaluation of anti-ophidian properties of natural products. *Paeonia parnassica*, a Greek endemic species, and three *Aristolochia* spp. were chosen for fractionation and separation of their chemical constituents by means of Centrifugal Partition Chromatography. The obtained fractions were evaluated for their ability to inhibit the enzyme targets where the initial extract was active. In parallel the chemical composition of each fraction was established by NMR-dereplication approach and analyzed by HPTLC. Finally, ten anti-acetylcholinesterase and anti-hyaluronidase components belonging to phenolics and flavonoids from *Paeonia parnassica* were identified.

[1] Molander M, Nielsen L, Sogaard S, Staerk D, Rønsted N, Diallo D, Chifundera KZ, Staden J, Jäger AK. *J Ethnopharmacology* 2014; 18:157:171 – 80

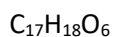
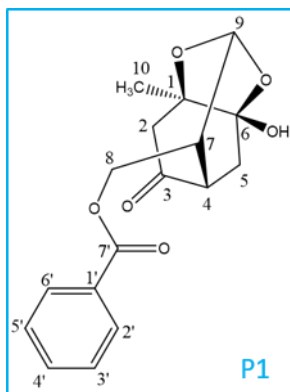
14.3.8 Απομόνωση και ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών

- ❖ Υδατομεθανολικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων του είδους *Paeonia parnassica* (Κωδικός εκχυλίσματος: PPAC):

Από την αρχική κλασμάτωση του εκχυλίσματος PPAC με FCPC προέκυψαν οι παρακάτω ουσίες:

1. Παιωνιφλοριγενόνη (Ppa FR.1) (Μεταβολίτης P1)
2. Μείγμα των δύο διγαλλικών μεθυλεστέρων (Ppa FR.4 και Ppa FR.5) (Μεταβολίτες P2, P3)
3. Γαλλικός μεθυλεστέρας (Ppa FR.6 (καθαρότητα > 90%), Ppa FR.7 (καθαρότητα > 99%), Ppa FR.8 (καθαρότητα > 99%), Ppa FR.9 (καθαρότητα > 99%), Ppa FR.10 (καθαρότητα > 90%)) (Μεταβολίτης P4)
4. 3-Ο-α-αραβινοπυρανοσίδης της καμπφερόλης (Ppa FR.13 (υψηλότερη καθαρότητα σε σχέση με το Ppa FR.14), Ppa FR.14) (Μεταβολίτης P5)
5. 3-Ο-α-αραβινοπυρανοσίδης της κερκετίνης (Ppa FR.16, Ppa FR.17 (υψηλότερη καθαρότητα σε σχέση με τα Ppa FR.16 και Ppa FR.18), Ppa FR.18) (Μεταβολίτης P6)
6. Μείγμα των δύο διγαλλικών οξέων (Ppa FR.19) (Μεταβολίτες P7, P8)
7. 1,2,3,4,6-πεντα-Ο-γαλλοϋλο-β-D-γλυκοπυρανόση (PGG) (Ppa FR.29 (υψηλότερη καθαρότητα σε σχέση με τα Ppa FR.30 και Ppa FR.31), Ppa FR.30, Ppa FR.31) (Μεταβολίτης P9)
8. 3-Ο-σοφοροσίδης της 8-μεθοξυκαμπφερόλης (Ppa FR.43) (Μεταβολίτης P10)
9. 3-Ο-σοφοροσίδης της λιμοσιτρίνης (Ppa FR.45, Ppa FR.46) (Μεταβολίτης P11)

Ο μεταβολίτης P1 ταυτοποιήθηκε ως η παιωνιφλοριγενόνη. Πρόκειται ένα μονοτερπένιο πινανίου, χαρακτηριστικό μεταβολίτη του γένους, με μοριακό βάρος 318.32 g/mol. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του (¹H-NMR και HMBC) σε διαλύτη CDCl₃ συγκρίθηκαν και επιβεβαιώθηκαν με δεδομένα από τη βιβλιογραφία⁴²⁵.



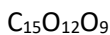
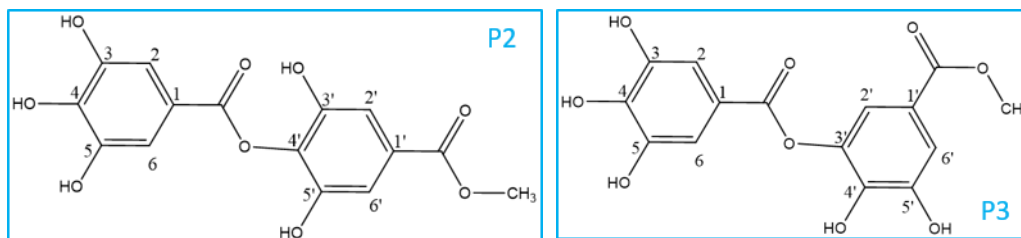
Πίνακας 82. Φασματοσκοπικά δεδομένα της παιωνιφλοριγενόνης ($CDCl_3$, 600 MHz)

Θέση	1H -NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]	^{13}C -NMR (ppm)
H-1	-	77.98
H-2a	2.56 (1H, d, $J = 17.0$ Hz)	46.05
H-2b	2.80 (1H, d, $J = 17.0$ Hz)	46.05
H-3	-	208.76
H-4	2.88 (1H, m)	45.96
H-5a	2.38 (1H, dd, $J = 13.5/3.2$ Hz)	33.15
H-5b	2.27 (1H, dd, $J = 13.5/2.5$ Hz)	33.15
H-6	-	101.86
H-7	2.42 (1H, dd, $J = 8.7/6.1$ Hz)	42.90
H-8a	4.28 (1H, dd, $J = 10.7/6.1$ Hz)	61.69
H-8b	4.08 (1H, dd, $J = 10.7/8.7$ Hz)	61.69
H-9	5.43 (1H, s)	99.90
H-10	1.30 (3H, s)	20.54
H-1'	-	129.95
H-2'/ H-6'	8.04 (2H, dd, $J = 7.8/1.4$ Hz)	129.58
H-3'/ H-5'	7.50 (2H, t, $J = 7.8$ Hz)	128.70
H-4'	7.63 (1H, tt, $J = 7.8/1.4$ Hz)	133.17
H-7'	-	166.06

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ παρατηρούμε τρεις κορυφές στην αρωματική περιοχή (7.50-8.04 ppm), οι οποίες αντιστοιχούν στα 5 πρωτόνια ενός μονοϋποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου. Στα 5.43 ppm εντοπίζεται η απλή κορυφή του ακεταλικού πρωτονίου (H-9), ενώ τα μεθυλενικά πρωτόνια της θέσης 8 εντοπίζονται στα 4.08 και 4.28 ppm, ως διπλές διπλών κορυφές με σταθερές σύζευξης 10.7/6.1 Hz και 10.7/8.7 Hz. Τα πρωτόνια του μεθυλίου παρατηρούνται στα 1.30 ppm ως μια απλή κορυφή. Στα 2.88 ppm εντοπίζεται το πρωτόνιο της θέσεως 4 ως πολλαπλή κορυφή. Το πρωτόνιο της θέσεως 7 εντοπίζεται στα 2.42 ppm ως διπλή διπλών κορυφή με $J = 8.7/6.1$ Hz. Στα 2.80 ppm και 2.56 ppm παρατηρούνται οι κορυφές των πρωτονίων της θέσης 2 ως διπλές κορυφές και στα 2.38 ppm και 2.27 ppm οι κορυφές των πρωτονίων της θέσεως 5 ως διπλές διπλών κορυφές.

Η παιωνιφλοριγενόνη ανήκει στα μονοτερπένια. Αποτελεί χαρακτηριστικό μεταβολίτη του γένους *Paeonia*. Απομονώθηκε πρώτη φορά το 1981 από το αιθερικό κλάσμα υδατικού εκχυλίσματος των ριζών του είδους *Paeonia albiflora*⁴²⁵. Έχει απομονωθεί ξανά από το διχλωρομεθανικό εκχύλισμα των ριζών του είδους *Paeonia parnassica*³⁸⁸, ενώ δεν υπάρχει αναφορά για την ύπαρξη του μεταβολίτη στα υπέργεια τμήματα του είδους. Επίσης έχει παραληφθεί από το διχλωρομεθανικό εκχύλισμα ριζών του ελληνικού ενδημικού είδους *Paeonia clusii* subsp. *clusii*⁴²⁶ και από το κλάσμα χλωροφορμίου μεθανολικού εκχυλίσματος ριζών του είδους *Paeonia lactiflora*⁴²⁷. Σε μελέτη που έγινε η παιωνιφλοριγενόνη, απομονωμένη από το αιθανολικό εκχύλισμα των ριζών του είδους *Paeonia suffruticosa*, επέδειξε κυτταροστατική δράση σε σειρές κυττάρων προμυελωκυτταρικής λευχαιμίας (HL60), καρκίνου του τραχήλου (HeLa) και T-λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας Jurkat, προκαλώντας απόπτωση των καρκινικών κυττάρων μέσω της ενεργοποίησης caspase-3⁴²⁸. Ο συγκεκριμένος μεταβολίτης έχει αναφερθεί ακόμη ως κυτταροτοξικός σε N9 μικρογλοιακά κύτταρα⁴²⁹. Δεν υπάρχει αναφορά ως προς την επίδραση της ουσίας επί της AChE, αλλά έχει δειχθεί ότι αποτελεί έναν αποπολωτικό νευρομυϊκό αποκλειστή ο οποίος μιμείται τη δράση της σουκινυλοχολίνης, χωρίς όμως να προκαλεί σύσπαση. Η συγκεκριμένη δράση ενισχύεται όταν γίνει συγχορήγηση με γλυκυρριζίνη όπως προκύπτει από εθνοφαρμακολογικά δεδομένα^{430 431}. Επίσης η παιωνιφλοριγενόνη εμφανίζει αντιπηκτική δράση. Σε περιπτώσεις που έγινε αντιληπτή η μη φυσιολογική πήξη του αίματος, ο συγκεκριμένος μεταβολίτης παρουσίασε ισχυρότερη (διπλάσια) δράση σε σχέση με τον γνωστό αντιπηκτικό παράγοντα, ακετυλοσαλικυλικό οξύ⁴³². Τέλος, η ουσία αυτή φέρει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, καθώς έχει την ικανότητα ελάττωσης του NO σε μικρογλοιακές κυτταρικές σειρές N9 μυών όταν έχει προηγηθεί ενεργοποίηση από λιποπολυσακχαρίτες⁴⁰⁸.

Οι μεταβολίτες **P2** και **P3** παραλήφθηκαν σε μείγμα και ταυτοποιήθηκαν ως ο *παρα*-διγαλλικός και ο *μετα*-διγαλλικός μεθυλεστέρας (methyl 3,4-dihydroxy-5-(3,4,5-trihydroxybenzoyl)oxybenzoate-methyl-m-digallate) (MW=336.25 g/mol) με τη βοήθεια φασματοσκοπικών δεδομένων NMR ($1D-^1H$ NMR) τα οποία συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα βιβλιογραφικά δεδομένα⁴³³.



Πίνακας 83. Φασματοσκοπικά δεδομένα του *παρα*-διγαλλικού μεθυλεστέρα (MeOD, 600 MHz)

Θέση	1H -NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]
2/6	7.10 (2H, s)
2'/6'	7.23 (2H, s)
CH₃O-	3.86 (3H, s)

Πίνακας 84. Φασματοσκοπικά δεδομένα του *μετα*-διγαλλικού μεθυλεστέρα (MeOD, 600 MHz)

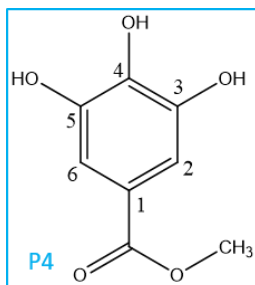
Θέση	1H -NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]
2/6	7.21 (2H, s)
2'	7.39 (1H, d, $J = 2.0$ Hz)
6'	7.26 (1H, d, $J = 2.0$ Hz)
CH₃O-	3.81 (3H, s)

Στο φάσμα 1H -NMR υπάρχουν 3 κορυφές στα 7.23 ppm, 7.10 ppm, 3.86 ppm, οι οποίες αντιστοιχούν στα αρωματικά πρωτόνια H-2/H-6, στα αρωματικά πρωτόνια H-2'/H-6' και τα στα τρία πρωτόνια της μεθοξυλομάδας του *παρα*-διγαλλικού μεθυλεστέρα. Ακόμη παρατηρούνται δύο διπλές κορυφές στα 7.39 ppm και 7.26 ppm, με σταθερά σύζευξης 2.0 Hz που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμία και αντιστοιχούν στα μη ισοδύναμα πρωτόνια των θέσεων 2' και 6' του *μετα*-διγαλλικού μεθυλεστέρα. Στα 7.21 ppm και 3.81 ppm υπάρχουν όπως και προηγουμένως οι κορυφές των ισοδύναμων πρωτονίων των θέσεων 2, 6 και της μεθοξυλομάδας

του μετα-διγαλλικού μεθυλεστέρα.

Οι δύο μεθυλεστέρες του διγαλλικού οξέος παραλαμβάνονται πάντα ως μείγματα διαφόρων αναλογιών⁴³⁷. Απομονώνονται πρώτη φορά από το είδος *P. parnassica*, ενώ έχουν ανιχνευθεί ξανά στα υπέργεια τμήματα του είδους *P. rockii*⁴³⁴. Επίσης ο διγαλλικός μεθυλεστέρας έχει ανιχνευθεί στους καρπούς του είδους *Rhus coriaria* (Sumac) (Anacardiaceae)⁴³⁵. Από το μεθανολικό εκχύλισμα φύλλων και κλαδιών του είδους *Swintonia foxworthyi* (Anacardiaceae) παραλήφθηκε το μείγμα μετα- και παρα- διγαλλικού μεθυλεστέρα σε αναλογία 2.2:1, το οποίο επέδειξε ανασταλτική δράση έναντι του πλασμοδίου (*Plasmodium falciparum*)⁴³³. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι ο διγαλλικός μεθυλεστέρας έχει *in vitro* αντική δράση⁴³⁶.

Ο μεταβολίτης P4 ταυτοποιήθηκε ως ο γαλλικός μεθυλεστέρας με τη βοήθεια ¹H NMR δεδομένων και αντιπαραβολή αυτών με την κατάλληλη βιβλιογραφία⁴³⁸. Πρόκειται για ένα απλό φαινολικό παράγωγο με MW=184.15 g/mol.



Πίνακας 85. Φασματοσκοπικά δεδομένα του γαλλικού μεθυλεστέρα (MeOD, 600 MHz)

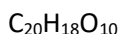
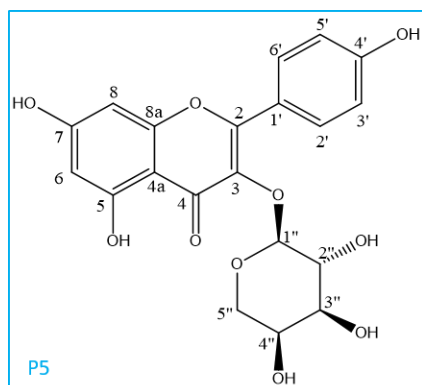
Θέση	¹ H-NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]
2/6	7.06 (2H, s)
CH ₃ O-	3.83 (3H, s)

Στο φάσμα ¹H-NMR παρατηρούμε δύο απλές κορυφές στα 7.06 ppm και στα 3.83 ppm, οι οποίες ολοκληρώνουν για δύο και τρία πρωτόνια αντίστοιχα και ανήκουν στα πρωτόνια των θέσεων 2/6 και στητης μεθοξυλομάδας.

Η ουσία έχει απομονωθεί ξανά από το υδατικό εκχύλισμα των ριζών του είδους *P. parnassica*³⁸⁸. Αποτελεί κοινό μεταβολίτη του γένους, καθώς έχει παραληφθεί και από άλλα είδη όπως *P. suffruticosa* (φλοιός ρίζας και καρπός), *P. lactiflora* (ρίζα), *P. anomala* (φύλλα), *P.*

decomposita (φλοιός ρίζας), *P. delavayi* (φλοιός ρίζας)³⁷⁸. Είναι μια φαινολική ένωση αρκετά διαδεδομένη στο φυτικό βασίλειο. Σε έλεγχο ικανότητας εξουδετέρωσης της ελεύθερης ρίζας DPPH, ο γαλλικός μεθυλεστέρας που απομονώθηκε από αιθανολικό εκχύλισμα ριζών *P. lactiflora* και από υδραλκολικό εκχύλισμα φύλλων *P. anomala* επέδειξε ισχυρή αντιοξειδωτική δράση⁴³⁹. Παρουσιάζει αντιφλεγμονώδη δράση, καθώς δρα ως διπλός αναστολέας τόσο της κυκλοοξυγενάσης 2 (COX-2) όσο και της 5 λιποξυγενάσης (5-LOX), αναστέλλοντας κατά συνέπεια την παραγωγή προσταγλανδινών⁴⁴⁰. Επίσης έχει αποδειχθεί ότι ο συγκεκριμένος μεταβολίτης διαθέτει αντι-ογκογόνο, αντιμικροβιακή, αντιπρωτοζωική δράση, αναστέλλει τη λιπιδική υπεροξειδωση και προστατεύει το DNA από το οξειδωτικό στρες. Ο γαλλικός μεθυλεστέρας διαθέτει αντική δράση έναντι του ερπητοϊού HSV-2, η οποία φαίνεται να είναι ισχυρότερη σε σύγκριση με αυτή που επιδεικνύουν άλλα ανάλογά του, λόγω της ταυτόχρονης παρουσίας στη δομή του τριών υδροξυλομάδων και μιας αλυσίδας αλκυλεστέρα⁴⁴¹. Το μεθανολικό εκχύλισμα της *P. suffruticosa* φέρει την ικανότητα να μειώνει τη σουκρόζη του εντέρου επίμυων και το υπεύθυνο δραστικό συστατικό είναι ο γαλλικός μεθυλεστέρας⁴³⁹. Σε δοκιμασία αναστολής της AChE δεν επέδειξε ισχυρή δράση σε αντίθεση με τον πιο υδρόφοβο γαλλικό αιθυλεστέρα³⁵⁴. Τέλος, με βάση τα αποτελέσματα σύγχρονης μελέτης ο γαλλικός μεθυλεστέρας δεν παρουσιάζει αξιοσημείωτη αναστολή της υαλουρονιδάσης¹¹⁴.

Ο μεταβολίτης **P5** ταυτοποιήθηκε ως ο 3-Ο-α-αραβινοπυρανοσίδης της καιμπφερόλης (juglalin) με τη βοήθεια 1D-¹H NMR δεδομένων και αντιπαραβολή αυτών με τη βιβλιογραφία⁴⁴³⁴⁴⁴. Αποτελεί ένα γλυκοζυλιωμένο φλαβονοειδές με MW=418.354 g/mol.



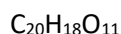
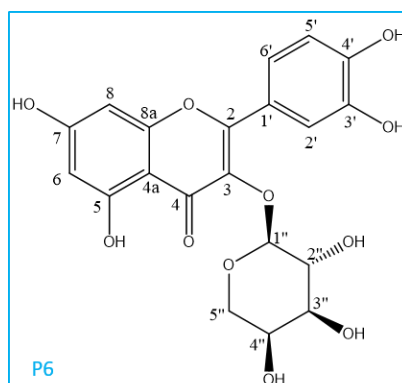
Πίνακας 86. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 3-O-α-αραβινοπυρανοσίδης της καιμπφερόλης (MeOD, 600 MHz)

Θέση	¹ H-NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]
6	6.23 (1H, d, $J = 2.0$ Hz)
8	6.43 (1H, d, $J = 2.0$ Hz)
2'/6'	8.08 (2H, d, $J = 9.0$ Hz)
3'/5'	6.91 (2H, d, $J = 9.0$ Hz)
1''	5.17 (1H, d, $J = 6.2$ Hz)
2''	3.91 (1H, dd, $J = 8.2/6.2$ Hz)
3''	3.65 (1H, dd, $J = 8.2/3.0$ Hz)
4''/5''a	3.90-4.00 (2H)
5''b	3.42 (1H, dd, $J = 11.5/1.1$ Hz)

Στο φάσμα ¹H-NMR παρατηρούμε δύο διπλές κορυφές με σταθερά σύζευξης 9.0 Hz, στα 8.08 ppm και 6.91 ppm, οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια του παρα- υποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου. Χαρακτηριστικές είναι οι κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια 6 και 8 του Α δακτυλίου φλαβονοειδούς, οι οποίες εντοπίζονται στα 6.23 ppm και 6.43 ppm, αντίστοιχα. Το πρωτόνιο που παρατηρείται στα 5.17 ppm ως μια διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 6.2 Hz αντιστοιχεί στο ανωμερικό πρωτόνιο της αραβινόσης.

Ο αραβινοσίδης της καιμπφερόλης ανήκει στην κατηγορία φλαβονοειδών (φλαβονολών) που φέρουν σάκχαρο στο υδροξύλιο της θέσης 3. Έχει ανιχνευθεί ξανά σε εκχύλισμα των κίτρινων ανθέων του δέντρου κινέζικης παιώνιας (section *Moutan*)⁴⁴⁵. Στην παρούσα μελέτη απομονώνεται πρώτη φορά από το υδραλκολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του είδους. Στο γένος *Raeonia* απομονώνονται συνήθως παράγωγα καιμπφερόλης που φέρουν ένα ή περισσότερα σάκχαρα όπως γλυκόση, αραβινόση στις θέσεις 3 ή/και 7 του σκελετού τους. Επίσης έχει απομονωθεί από τα φύλλα και τους καρπούς ειδών του γένους *Foeniculum* (Ariaceae)⁴⁴⁶, από είδη του γένους *Guatteria* (Annonaceae), από την οικογένεια Rosaceae (*Rosa* spp., *Prunus* sp., *Sorbaria* sp.), από τα είδη *Polygonum aviculare*, *Juglans regia* και το βλαστό είδους *Solenostemma argel* (Aprocynaceae)⁴⁴⁷. Έχει αναφερθεί η ανασταλτική δράση της ουσίας επί του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης και η συνεπαγόμενη αντι-υπερτασική δράση της⁴⁴⁸, η αντιοξειδωτική⁴⁴⁹, αντιβακτηριακή και κυτταροτοξική δράση.

Ο μεταβολίτης **P6** ταυτοποιήθηκε ως ο 3-*O*- α -αραβινοπυρανοσίδης της κερκετίνης (guaijaverin) με τη βοήθεια NMR πειραμάτων 1D και 2D (^1H , ^1H - ^{13}C HMBC και ^1H - ^{13}C HSQC) και σύγκριση των δεδομένων που προέκυψαν με τη βιβλιογραφία^{450 451}. Αποτελεί ένα γλυκοζυλιωμένο φλαβονοειδές με MW=434.355 g/mol.



Πίνακας 87. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 3-*O*- α -αραβινοπυρανοσίδης της κερκετίνης (MeOD, 600 MHz)

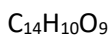
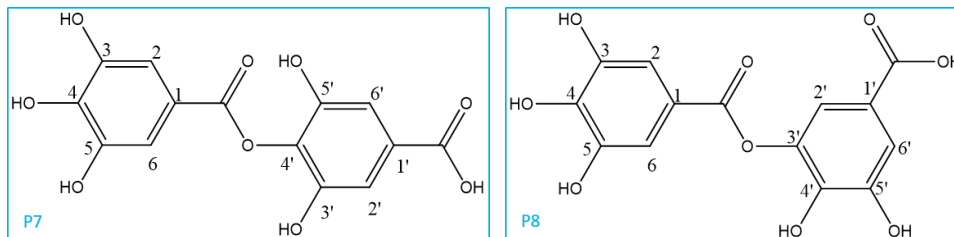
Θέση	^1H -NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]	^{13}C (ppm)
2	-	157.01
3	-	133.98
4	-	164.85
4a	-	104.05
5	-	161.74
6	6.23 (1H, d, J = 2.1 Hz)	100.42
7	-	164.81
8	6.42 (1H, d, J = 2.1 Hz)	95.19
8a	-	157.04
1'	-	121.74
2'	7.76 (1H, d, J = 2.0 Hz)	117.94
3'	-	144.56
4'	-	148.37
5'	6.89 (1H, d, J = 8.4 Hz)	116.76
6'	7.60 (1H, dd, J = 8.4/2.0 Hz)	123.54
1''	5.18 (1H, d, J = 6.5 Hz)	105.20

2''	3.92 (1H, dd, $J = 8.3/6.5$ Hz)		73.28
3''	3.66 (1H, dd, $J = 8.3/3.2$ Hz)		74.63
4''	3.83 (1H, m)		69.73
5''	(a) 3.84 (1H, dd, $J = 9.9/3.4$ Hz)	(b) 3.47 (1H, dd, $J = 14.0/3.4$ Hz)	67.53

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ παρατηρούμε ένα ABX σύστημα με τρεις κορυφές στα 7.76 ppm (d, $J = 2.0$ Hz), 7.60 ppm (dd, $J = 8.4/2.0$ Hz) και 6.89 ppm (d, $J = 8.4$ Hz), οι οποίες ανήκουν στα πρωτόνια των θέσεων 2', 6' και 5', αντίστοιχα, του Β δακτυλίου. Χαρακτηριστικές είναι οι κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια 6 και 8 του Α δακτυλίου, οι οποίες εντοπίζονται στα 6.23 ppm και 6.42 ppm, αντίστοιχα. Το πρωτόνιο που εντοπίζεται στα 5.18 ppm ως μια διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 6.5 Hz αντιστοιχεί στο ανωμερικό πρωτόνιο της αραβινόσης. Τα σήματα των ανθράκων των θέσεων 6 και 8 εντοπίζονται στα 100.42 ppm και 95.19 ppm αντίστοιχα, και των θέσεων 2', 5' και 6' στα 117.94 ppm, 116.76 ppm και 123.54 ppm. Ο άνθρακας του ανωμερικού πρωτονίου της αραβινόσης παρατηρείται στα 105.20 ppm.

Ο αραβινοσίδης της κερκετίνης ανήκει στην κατηγορία φλαβονολών που φέρουν σάκχαρο στο υδροξύλιο της θέσης 3. Δεν έχει απομονωθεί ξανά από το συγκεκριμένο είδος ενώ έχει αναφερθεί η ύπαρξη του σε άλλα είδη του γένους, όπως στα φύλλα του είδους *Paeonia tenuifolia*³⁷⁸. Στην παρούσα μελέτη απομονώνεται από το υδραλκολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του είδους. Επίσης, έχει απομονωθεί από φύλλα και άνθη του είδους *Hypericum brasiliense* (Guttiferae) και από τα φύλλα του είδους *Myrcia multiflora* (Myrtaceae). Έχει αναφερθεί η ανασταλτική δράση του συγκεκριμένου μεταβολίτη (απομονωμένου από το μεθανολικό εκχύλισμα φύλλων του τροπικού είδους *Planchonella obovata*) ενάντια στην α-γλυκοσιδάση, ένζυμο που εμπλέκεται στη ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης και του οποίου οι αναστολείς αποτελούν θεραπευτικούς παράγοντες κατά του διαβήτη τύπου II⁴⁵². Επίσης, ο 3-Ο-αραβινοσίδης της κερκετίνης εντάσσεται σε πατέντα με άλλα παράγωγα βενζοπυρανόνης, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην αντιμετώπιση σοβαρού οξέος αναπνευστικού συνδρόμου (SARS). Έχουν αναφερθεί η αντιφλεγμονώδης δράση μέσω αναστολής της IL-5⁴⁵³, η μέτρια δραστηριότητα στην αναστολή τυροσινάσης (απομόνωση από υδραλκολικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων του είδους *Alchemilla barbatiflora* (Rosaceae))⁴⁵¹, η αντιοξειδωτική δράση (απομόνωση από μεθανολικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων *Loranthus regularis* (Loranthaceae))⁴⁵⁴ και η αντιμικροβιακή δράση του β-D-αραβινοσίδη κερκετίνης⁴⁵⁵.

Οι μεταβολίτες P7 και P8 ταυτοποιήθηκαν ως το *παρα*-διγαλλικό οξύ και το *μετα*-διγαλλικό οξύ (MW=322.225 g/mol) με τη βοήθεια ¹H-NMR πειραμάτων και σύγκριση των δεδομένων που προέκυψαν με τη βιβλιογραφία⁴⁵⁶.



Πίνακας 88. Φασματοσκοπικά δεδομένα του *παρα*-διγαλλικού οξέος (MeOD, 600 MHz)

Θέση	¹ H-NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]
2/6	7.14 (2H, s)
2'/6'	7.26 (2H, s)

Πίνακας 89. Φασματοσκοπικά δεδομένα του *μετα*-διγαλλικού οξέος (MeOD, 600 MHz)

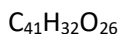
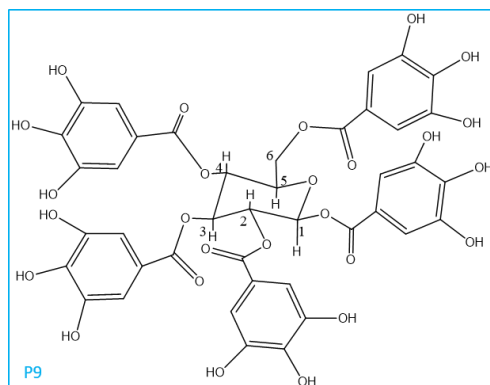
Θέση	¹ H-NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]
2/6	7.24 (2H, s)
2'	7.42 (1H, d, J = 2.1 Hz)
6'	7.28 (1H, d, J = 2.1 Hz)

Στο φάσμα ¹H-NMR υπάρχουν 2 κορυφές στα 7.26 ppm και 7.14 ppm, οι οποίες ολοκληρώνουν για 2 πρωτόνια καθεμία και αντιστοιχούν στα τέσσερα, ανά δύο ισοδύναμα, πρωτόνια των θέσεων 2, 6 και 2', 6' του *παρα*-διγαλλικού οξέος, ενώ και στα 7.24 ppm εντοπίζεται η απλή κορυφή των δύο ισοδύναμων πρωτονίων των θέσεων 2 και 6 του *μετα*-διγαλλικού οξέος. Στα 7.42 ppm και 7.28 ppm υπάρχουν δύο διπλές κορυφές με σταθερά σύζευξης 2.1 Hz, οι οποίες ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο καθεμία και ανήκουν στα πρωτόνια των θέσεων 2' και 6' του *μετα*-διγαλλικού οξέος.

Το μείγμα των δύο διγαλλικών οξέων παραλαμβάνεται πρώτη φορά από το είδος *Raeonia rarnassica*, ενώ έχει ανιχνευθεί ξανά σε άλλα είδη της οικογένειας Raeoniaceae. Το *μετα*-διγαλλικό οξύ έχει ανιχνευθεί σε είδη όπως το *Terminalia chebula* (Combretaceae) (καρπού), όπου αξιολογήθηκε ως προς την ικανότητα αναστολής βουτυρυλοχολινεστεράσης και

ακετυλοχολινεστεράσης μη επιδεικνύοντας αξιόλογα αποτελέσματα⁴⁵⁷, από το δέντρο *Parrotia persica* (Hamamelidaceae) (φύλλα)⁴⁵⁸, από το φλοιό του φρούτου μάνγκο (*Mangifera indica* (Anacardiaceae))⁴⁵⁹, από τα φύλλα του *Acer rubrum* (Sapindaceae)⁴⁶⁰, από τα υπέργεια τμήματα των ειδών *Tamarix hispida*⁴⁶¹ και *Tamarix articulata*⁴⁶² (Tamaricaceae) και από τους καρπούς του είδους *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae), επιδεικνύοντας αντι-μεταλλαξιγόνες ιδιότητες, αναστολή της ξανθινοξειδάσης και εξουδετέρωση της υπεροξειδικής ρίζας⁴⁶³. Το μείγμα των μετα- και παρα- διγαλλικών οξέων έχει παρουσιάσει σημαντική ηπατοπροστατευτική δράση σε Hep G2 κυτταροτοξικότητα επαγόμενη τόσο από τακρίνη όσο και από νιτροφουραντοΐνη⁴⁶⁴, έχει παραληφθεί από το εκχύλισμα ακετόνης:νερού των φύλλων του είδους *Pistacia atlantica* (Anacardiaceae) όπου εμφάνισε σημαντική δράση ως αντι-υπεργλυκαιμικός παράγοντας προκαλώντας αναστολή των ενζύμων α-αμυλάση (IC₅₀=54 μg/mL) και α-γλυκοσιδάση (IC₅₀=13 μg/mL), αλλά και αντι-υπερτασική μέσω αναστολής του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης (IC₅₀=110 μg/mL)⁴⁶⁵.

Ο μεταβολίτης P9 ταυτοποιήθηκε ως η 1,2,3,4,6-πεντα-*O*-γαλλοϋλο-β-D-γλυκοκυρανόση (PGG) (MW=940.681 g/mol) με τη βοήθεια 1D και 2D NMR πειραμάτων (¹H, COSY, ¹H-¹³C HMBC) και σύγκριση των δεδομένων που προέκυψαν με τη βιβλιογραφία⁴⁶⁶.



Πίνακας 90. Φασματοσκοπικά δεδομένα της 1,2,3,4,6-πεντα-*O*-γαλλοϋλο-β-D-γλυκοκυρανόσης (PGG) (MeOD, 600 MHz)

Θέση	¹ H-NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]	¹³ C (ppm)
1(glc)	6.25 (1H, d, J = 8.3 Hz)	94.17
2(glc)	5.61 (1H, dd, J = 9.6/8.3 Hz)	70.10
3(glc)	5.92 (1H, t, J = 9.6 Hz)	74.38

4(glc)	5.64 (1H, t, $J = 9.6$ Hz)	72.39
5(glc)	4.51 (1H, m)	74.68
6(glc)	(a) 4.40 (1H, dd, $J = 12.0/4.4$ Hz) (b) 4.41 (1H, m)	63.20
1'(gallic acid)	-	121.25
1'(gallic acid)	-	120.12
1'(gallic acid)	-	120.48
1'(gallic acid)	-	120.51
1'(gallic acid)	-	120.54
2',6'(gallic acids)	7.13 (2H, s) / 7.07 (2H, s) / 7.00 (2H, s) / 6.97 (2H, s) / 6.92 (2H, s)	110.51 / 110.80 / 110.64 / 110.56 / 110.59
3',5'(gallic acid)	-	146.73
3',5'(gallic acid)	-	146.77
3',5'(gallic acid)	-	146.62
3',5'(gallic acid)	-	146.60
3',5'(gallic acid)	-	146.53
4'(gallic acid)	-	140.38
4'(gallic acid)	-	141.11
4'(gallic acid)	-	140.58

4'(gallic acid)	-	140.57
4'(gallic acid)	-	140.39
-COO-(gallic acid)	-	168.09
-COO-(gallic acid)	-	166.39
-COO-(gallic acid)	-	167.12
-COO-(gallic acid)	-	167.26
-COO-(gallic acid)	-	167.54

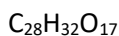
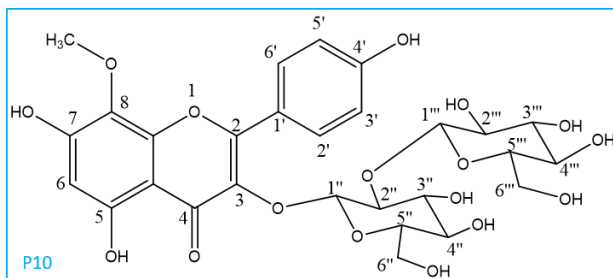
Ο μεταβολίτης ανήκει στις υδρολυόμενες γαλλοταννίνες. Η β-PGG φέρει πέντε εστερικούς δεσμούς οι οποίοι σχηματίζονται ανάμεσα στις καρβοξυλικές ομάδες των γαλλικών οξέων και στις αλειφατικές υδροξυλομάδες ενός μορίου γλυκόσης (glc). Στο φάσμα ¹H-NMR χαρακτηριστικά εντοπίζονται πέντε απλές κορυφές στην αρωματική περιοχή (6.92-7.13 ppm), που η καθεμία ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχούν στα πρωτόνια των θέσεων 2 και 6 των πέντε γαλλικών οξέων. Το ανωμερικό πρωτόνιο της γλυκόσης παρατηρείται στα 6.25 ppm ως μια διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 8.3 Hz. Τα υπόλοιπα πρωτόνια της γλυκόσης εντοπίζονται στα 5.92-4.40 ppm. Ο ανωμερικός άνθρακας της γλυκόσης παρατηρείται στα 94.17 ppm. Οι άνθρακες των θέσεων 1', 2'/6', 3'/5' και 4' των πέντε μονάδων γαλλικού οξέος εντοπίζονται σε δ 120.12-121.25, 110.51-110.81, 146.53-146.77 και 140.38-141.11, αντίστοιχα. Τέλος, οι άνθρακες των καρβονυλικών ομάδων των γαλλικών οξέων εμφανίζονται στα 166.39-168.09 ppm.

Αποτελεί έναν κοινό μεταβολίτη που απομονώνεται από διάφορους φυτικούς οργανισμούς, χερσαίους και θαλάσσιους³⁹⁸. Η β-PGG έχει μελετηθεί αρκετά λόγω αυτής της

αφθονίας, αν και το α ανωμερές της απαντάται επίσης στη φύση. Για το είδος της *Paeonia parnassica* δεν υπάρχει σχετική αναφορά, αν και έχει απομονωθεί αρκετές φορές από το γένος *Paeonia* (*P. lactiflora* (ρίζα), *P. lactiflora* var. *trichocarpa* (ρίζα), *P. suffruticosa* (φλοιός ρίζας και φρέσκα φύλλα))³⁷⁸. Συνολικά έχει εντοπιστεί σε 70 φυτικά είδη, σε διαφορετικά φυτικά μέρη και σε διαφορετικές περιεκτικότητες³⁹⁸. Ενδεικτικά αναφέρονται ως πηγές απομόνωσης τα είδη *Rhus chinensis* Mill (Anacardiaceae), *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae), *Acer truncatum* (Sapindaceae), *Terminalia chebula* (Combretaceae)⁴⁰⁰. Η β -PGG έχει δοκιμαστεί σε ποικίλους φαρμακολογικούς στόχους με αρκετά σημαντικά αποτελέσματα, τόσο σε *in vivo* όσο και σε *in vitro* πειράματα. Βασικό χαρακτηριστικό της, δεδομένου ότι αποτελεί μια γαλλοτανίνη, είναι η ικανότητα σύνδεσης και πρόκλησης καθίζησης των πρωτεϊνών, στην οποία βασίζονται πολλές φαρμακολογικές δράσεις του μεταβολίτη. Έχει δείχθει ότι ο συγκεκριμένος μεταβολίτης φέρει κυτταροτοξικές ιδιότητες έναντι καρκινικών κυττάρων (προ-απόπτωση, αυτοφαγία⁴⁶⁷, ικανότητα αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, αναστολής της μετάστασης και αναστολής της Ρ-γλυκοπρωτεΐνης σε σάρκωμα, μελάνωμα, λευχαιμία, καρκίνο προστάτη, πνεύμονα, στήθους, ήπατος) καθώς επίσης έχει επιδείξει αντιαγγειογενετικές, αντιμεταλλαξιόγόνες, αντιδιαβητικές (κυρίως η α -PGG (μιμείται την ινσουλίνη)), υπολιπιδαιμικές, αντιαλλεργικές, αντικικές, καρδιοπροστατευτικές (αντιυπερτασικό, αναστολή μετατρεπτικού ενζύμου αγγειοτενσίνης), νευροπροστατευτικές, αντιφλεγμονώδεις (αναστολή TNF- α , NF- κ B, IL-6, COX-2, iNOS), αντιεπιληπτικές δράσεις, ενώ συμβάλλει στην αντιμετώπιση στομαχικών διαταραχών, που οφείλονται σε αυξημένη συγκέντρωση γαστρικών οξέων όπως είναι η γαστρίτιδα και τα πεπτικά έλκη, σε διαταραχές πήξης αίματος και στην αποτροπή νεφρολιθίασης και ουρολιθίασης⁴⁰⁰. Έχει αναφερθεί η δράση του μεταβολίτη κατά του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού (*Helicobacter pylori*)⁴⁶⁸. Έχει αποδειχθεί η αντιοξειδωτική του δράση (δοκιμασία FRAP), καθώς και η ικανότητα αναστολής των ενζύμων ακετυλοχολινεστεράση και βουτυρυλοχολινεστεράση⁴⁶⁹. Αναστέλλει την α γλυκοσιδάση και παρουσιάζει αντιβιοτική δράση⁴⁷⁰. Απομονώθηκε από μεθανολικό εκχύλισμα φύλλων και βλαστών του είδους *Rhus trichocarpa* (Anacardiaceae) και αποδείχτηκε ως το υπεύθυνο δραστικό βακτηριοστατικό συστατικό του εκχυλίσματος έναντι στελεχών *Escherichia coli* και *Pseudomonas aeruginosa*⁴⁶⁶. Έχει δείχθει η αντιφλεγμονώδης δράση του συστατικού μέσω μείωσης κυτταροκινών σε μικρογλοιακά κύτταρα, οι οποίες εμπλέκονται σε παθήσεις όπως η άνοια και το Alzheimer⁴⁷¹. Ο συγκεκριμένος μεταβολίτης επιδεικνύει νευροπροστατευτική δράση περιορίζοντας *in vivo* το οξειδωτικό στρες των νευρώνων διαμέσου επαγωγής της έκφρασης του γονιδίου HO-1⁴⁷², αποτρέποντας *in vitro* την επαγόμενη από τις

αμυλοειδείς πλάκες νέκρωση των Β103 νευρώνων⁴⁷³, αναστέλλοντας την προλυλο-ενδοπεπτιδάση, ένζυμο που συμμετέχει στο μεταβολισμό νευροπεπτιδίων που φέρουν προλίνη⁴⁷⁴, αποτρέποντας *in vivo* και *in vitro* τη συσσώρευση πλακών της β- αμυλοειδούς πρωτεΐνης και επανασταθεροποιώντας τα φυσιολογικά β αμυλοειδή ινίδια⁴⁰⁹. Συστατικά που εντοπίζονται στα είδη του γένους *Raemonia*, όπως είναι η παιωνόλη, το βενζοϊκό οξύ και η παιωνιφλορίνη, δεν εμφανίζουν καμία επίδραση στη συσσώρευση των πλακών β- αμυλοειδούς αποδεικνύοντας έτσι ότι το δραστικό συστατικό των εκχυλισμάτων για αυτή τη δράση είναι η PGG⁴⁰⁹. Η νευροπροστασία που παρέχει η PGG σε συνδυασμό με τον σχετικά υδρόφοβο χαρακτήρα της, μπορεί να λειτουργήσει τόσο θεραπευτικά όσο και προληπτικά στη νόσο Alzheimer. Επιπλέον, η β-PGG αναστέλλει ένζυμα όπως η τυροσινάση (αναστολή μελανογένεσης)⁴⁷⁵, υαλουρονιδάση, φωσφολιπάση, L-αμινο οξειδάση δηλητηρίου φιδιού⁴⁷⁶, βόεια υαλουρονιδάση⁴⁷⁷, ελαστάση⁴⁷⁸, Na/K-ATPase, α-αμυλάση του σάλιου, MMP-9, συνθάση του NO, COX-2, β-οξοακυλο-ACP ρεδοκτάση, ενδοπεπτιδάση, αμινοπεπτιδάση N, DNA πολυμεράση⁴⁷⁹. Εμφανίζει προστατευτική δράση έναντι του οξειδωτικού στρες, ανοσορρυθμιστική και αντιπηκτική δράση⁴⁷⁹. Σε μελέτες τοξικότητας που έγιναν σε επίμυες αποδείχθηκε η οξεία τοξικότητα που μπορεί να προκαλέσει ο μεταβολίτης σε μεγάλες δόσεις και συγκεκριμένα: έγχυση 50-60 mg PGG ανά ζώο (~200 g βάρος σώματος) οδήγησε σε μια απότομη και θανάσιμη πτώση πίεσης μέσα σε 30 λεπτά, ενώ δόση 30 mg ανά ζώο δεν επηρέασε τα επίπεδα πίεσης και γλυκόζης αίματος⁴⁸⁰. Γενικά όμως θεωρείται μη τοξικός μεταβολίτης και δεν εμφανίζει ηπατοτοξικότητα⁴⁸¹. Η φαρμακοκινητική του δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένη και το φαρμακοφόρο τμήμα του παραμένει άγνωστο.

Ο μεταβολίτης P10 ταυτοποιήθηκε ως ο 3-Ο-σοφοροσίδης της 8-μεθοξυκαμπφερόλης (sexangularetin 3-Ο-β-D-sophoroside) (MW=640.547g/mol) με τη βοήθεια 1D και 2D NMR πειραμάτων και σύγκριση των δεδομένων που προέκυψαν με τη βιβλιογραφία⁴⁸².



Πίνακας 91. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 3-Ο-σοφοροσίδη της 8-μεθοξυκαμπφερόλης (MeOD, 600 MHz)

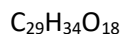
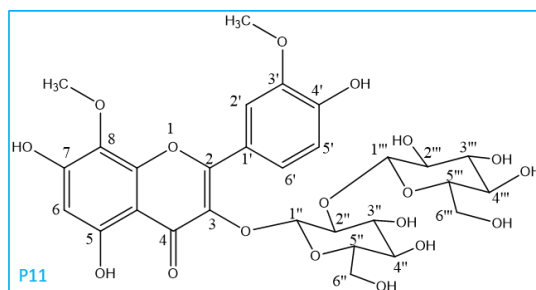
Θέση	¹ H-NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, <i>J</i> (Hz))]	¹³ C (ppm)
6	6.29 (1H, s)	99.18
2'/6'	8.13 (2H, d, <i>J</i> = 8.9 Hz)	130.83
4'	-	160.34
3'/5'	6.95 (2H, d, <i>J</i> = 8.9 Hz)	114.86
1''	5.50 (1H, d, <i>J</i> = 7.7 Hz)	101.76
1'''	4.78 (1H, d, <i>J</i> = 7.6 Hz)	100.25
CH ₃ O-	3.92 (3H, s)	67.76
2''-6'' 2'''-6''' (sophorosyl-)	4.00-3.00 (12H, m)	62.50-76.81

Ο μεταβολίτης ανήκει στην κατηγορία των φλαβονολών που φέρουν ένα δισακχαρίτη στο OH της 3 θέσης και είναι υποκατεστημένες στην 8 θέση. Στο φάσμα ¹H-NMR εντοπίζονται δύο διπλές κορυφές στα 8.13 ppm και 6.95 ppm με σταθερά σύζευξης 8.9 Hz και ολοκλήρωση για δύο πρωτόνια καθεμία, οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια των θέσεων 2', 6' και 3', 5' ενός A₂B₂ συστήματος. Χαρακτηριστική είναι η απουσία του πρωτονίου της θέσης 8, ενώ το πρωτόνιο της θέσης 6 εμφανίζεται ως απλή κορυφή στα 6.29 ppm. Επίσης, εντοπίζονται δύο διπλές κορυφές στα 5.50 ppm και 4.78 ppm, οι οποίες αντιστοιχούν στα δύο ανωμερικά πρωτόνια του σοφοροσίδη που συνδέεται με το υδροξύλιο της θέσης 3 της 8-μεθοξυκαμπφερόλης. Το μεθοξύλιο (CH₃O-) που αποτελεί τον υποκαταστάτη της θέσης 8 της φλαβονόλης εμφανίζεται ως απλή κορυφή που ολοκληρώνει για 3 πρωτόνια στα 3.92 ppm. Τα υπόλοιπα πρωτόνια της μονάδας του σοφοροσίδη εντοπίζονται στα 4.00-3.00 ppm.

Ο 3-Ο-σοφοροσίδης της 8-μεθοξυκαμπφερόλης απομονώνεται πρώτη φορά από το είδος *Paeonia parnassica* ενώ υπάρχει μία μόνο βιβλιογραφική αναφορά για την παραλαβή του μεταβολίτη από εκχύλισμα ανθέων του είδους *Paeonia tenuifolia*⁴⁸². Τα γλυκοζυλιωμένα 8-μεθοξυ-υποκατεστημένα φλαβονοειδή ανήκουν στους χαρακτηριστικούς μεταβολίτες των ανθέων και συγκεκριμένα των στημόνων και της γύρης του γένους *Paeonia*, ενώ δεν απαντώνται τόσο συχνά στη φύση. Η ουσία έχει παραληφθεί ξανά από τη γύρη του *Prunus amygdalus* (Rosaceae)⁴⁸³ και από το μεθανολικό εκχύλισμα των ανθέων του δέντρου *Bombax ceiba* (Malvaceae)⁴⁸⁴. Η γενίνη, η οποία απαντάται πιο συχνά, έχει παραληφθεί από διάφορα είδη: *Rhodiola bupleuroides* (ρίζες)⁴⁸⁵, *Rhodiola rosea* (ριζώματα)⁴⁸⁶ (Crassulaceae), *Crataegus*

monogyna (γύρη)⁴⁸⁷ και *Crataegus pinnatifida* (Rosaceae). Μέχρι σήμερα ο συγκεκριμένος μεταβολίτης δεν έχει αξιολογηθεί φαρμακολογικά σε κάποιο θεραπευτικό στόχο, αν και το άγλυκό του έχει επιδείξει αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική δράση σε δοκιμασία εξουδετέρωσης της ελεύθερης ρίζας DPPH, απομονωμένο από το μεθανολικό εκχύλισμα των ταξιανθιών του είδους *Sorbus intermedia* (Rosaceae)⁴⁸⁸.

Ο μεταβολίτης **P11** ταυτοποιήθηκε ως ο 3-*O*-σοφοροσίδης της λιμοσιτρίνης (limocitrin 3-*O*-β-D-sophoroside) (MW=670.573 g/mol) με τη βοήθεια πειραμάτων ¹H-NMR, COSY, HSQC-DEPT, HMBC και σύγκριση των δεδομένων που προέκυψαν με τη βιβλιογραφία⁴⁸².



Πίνακας 92. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 3-*O*-σοφοροσίδη της λιμοσιτρίνης (MeOD, 600 MHz)

Θέση	¹ H-NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]	¹³ C (ppm)
2	-	156.30
3	-	133.20
4	-	176.31
4a	-	105.46
5	-	156.30
6	6.30 (1H, s)	100.44
7	-	157.96
8	-	128.41
8a	-	148.50
1'	-	123.31

2'	7.90 (1H, d, $J = 1.8$ Hz)	114.52
3'	-	148.85
4'	-	150.51
5'	6.97 (1H, d, $J = 8.5$ Hz)	116.63
6'	7.76 (1H, dd, $J = 8.5/1.8$ Hz)	124.74
1''	5.64 (1H, d, $J = 7.6$ Hz)	101.19
1'''	4.80 (1H, d, $J = 7.2$ Hz)	104.77
CH₃O-3'	3.99 (3H, s)	57.53
CH₃O-8	3.93 (3H, s)	62.33
2''-6'' 2'''-6'''(sophorosyl-)	4.00-2.70 (12H, m)	63.71-82.63

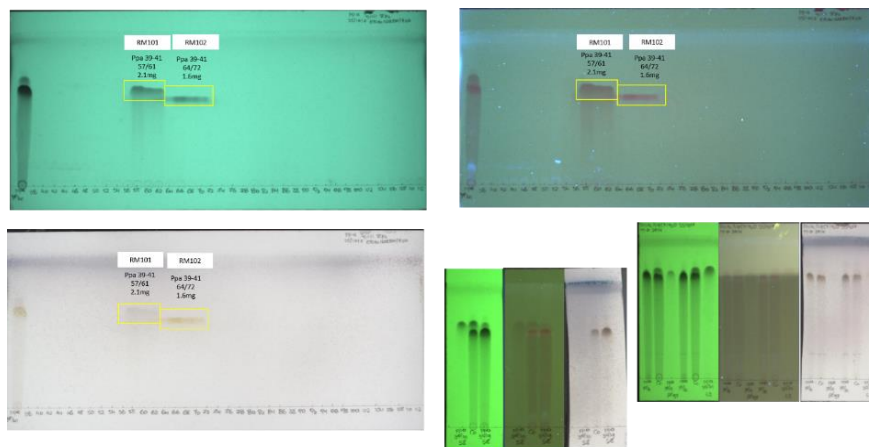
Ο μεταβολίτης ανήκει στην κατηγορία των φλαβονολών που φέρουν ένα δισακχαρίτη στο OH της 3 θέσης και είναι υποκατεστημένες στην 8 θέση. Στο φάσμα ¹H-NMR εντοπίζονται τρεις κορυφές στα 7.90 ppm ως διπλή με σταθερά σύζευξης 1.8 Hz και ολοκλήρωση για ένα πρωτόνιο, 7.76 ppm ως διπλή διπλών κορυφή με σταθερές σύζευξης 8.5 Hz και 1.8 Hz και 6.97 ppm ως διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 8.5 Hz, οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια των θέσεων 2', 6' και 5' ενός ABX συστήματος. Οι υπόλοιπες κορυφές του φάσματος είναι παρόμοιες με αυτές που περιγράφηκαν παραπάνω, με χαρακτηριστική την απουσία του πρωτονίου της θέσης 8 και την παρουσία μιας απλής κορυφής στα 6.30 ppm, η οποία ανήκει στο πρωτόνιο της θέσης 6.

Ο 3-Ο-σοφοροσίδης της λιμοσιτρίνης απομονώνεται πρώτη φορά από το είδος *Paeonia parnassica*, ενώ υπάρχει μία μόνο βιβλιογραφική αναφορά για την παραλαβή του μεταβολίτη από εκχύλισμα ανθέων του είδους *Paeonia tenuifolia*⁴⁸². Ο συγκεκριμένος δισακχαρίτης απαντάται σπανίως στη φύση και μέχρι σήμερα μόνο στο γένος *Paeonia*. Πιο συχνή είναι η απομόνωση της γενίνης από το φλοιό των ειδών *Citrus* (Rutaceae), του 3-Ο-ρουτινοσίδη από το ίδιο γένος, του 3-Ο-γλυκοσίδη από είδη *Citrus*, *Haplophyllum* (Rutaceae), *Sedum* (Crassulaceae)⁴⁸⁹, του 4'-Ο-γλυκοσίδη από το είδος *Erica cinerea* (Ericaceae)⁴⁸⁹, του 7-Ο-γλυκοσίδη και 3,7-Ο-διγλυκοσίδη από είδη του γένους *Sedum*⁴⁹⁰. Δεν έχουν αναφερθεί μελέτες σχετικές με την αξιολόγηση των βιολογικών του ιδιοτήτων. Ωστόσο παράγωγα αυτού, όπως ο 3-Ο-γλυκοσίδης της λιμοσιτρίνης, επέδειξε μικρή ικανότητα αναστολής της AChE⁴⁹¹ και η

λιμοσιτρίνη έχει παρουσιάσει ικανότητα αναστολής του παράγοντα TNF- α ⁴⁹² και αιμολυτική δράση⁴⁹³.

Επιπρόσθετα, με την εφαρμογή χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού, σε κλάσματα του εκχυλίσματος PPAC, απομονώθηκαν και άλλοι δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως περιγράφεται στη συνέχεια.

Κλάσμα Ppa FR.22: 73.4 mg του κλάσματος υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με στατική φάση sephadex LH-20 και κινητή φάση MeOH.



Εικόνα 202. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας των κλασμάτων της sephadex στο κλάσμα Ppa FR.22. Σύστημα ανάπτυξης EtOAc/MeOH/H₂O/FA 50/10/7/1

Συνολικά παρελήφθησαν 112 κλάσματα όγκου 500 μ L το καθένα, ενώ μετά από χρωματογραφικό έλεγχο με TLC πραγματοποιήθηκαν συνενώσεις και δύο από τα συνενωμένα κλάσματα ελέγχθησαν ως προς το περιεχόμενό τους με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

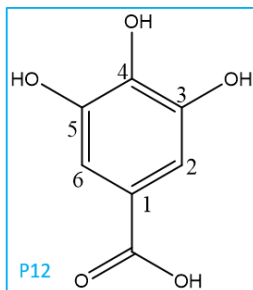
Πίνακας 93. Συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν από τη sephadex του κλάσματος Ppa FR.22.

Κωδικός κλάσματος	Κωδικός NMR	Βάρος δείγματος (mg)
Ppa 39-41 57/61	RM101	2.1
Ppa 39-41 64/72	RM102	1.6

Στο κλάσμα RM101 παραλήφθηκε το γαλλικό οξύ (Μεταβολίτης P12).

Στο κλάσμα RM102 παρελήφθησαν οι εξής τρεις ουσίες: γαλλικό οξύ (Μεταβολίτης P12), 3-O- β -D-γλυκοκυρανοσίδης της καιμπφερόλης (αστραγαλίνη) (Μεταβολίτης P13) και σε μικρή ποσότητα ο 3-O- β -D-γλυκοκυρανοσίδης της ισοραμεντίνης (Μεταβολίτης P14).

Ο μεταβολίτης P12 ταυτοποιήθηκε ως το γαλλικό οξύ (3,4,5-τριϋδροξυβενζοϊκό οξύ) (MW=170.12 g/mol) με τη βοήθεια 1D ¹H-NMR πειραμάτων και σύγκριση των δεδομένων που προέκυψαν με τη βιβλιογραφία⁴⁹⁴.



Πίνακας 94. Φασματοσκοπικά δεδομένα του γαλλικού οξέος (MeOD, 400 MHz)

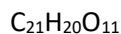
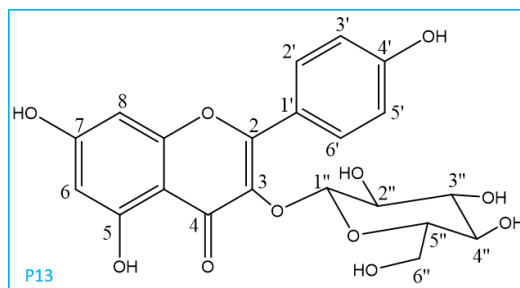
Θέση	¹ H-NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]
2/6	7.04 (2H, s)

Στο φάσμα ¹H-NMR χαρακτηριστικά εντοπίζεται μόνο μια απλή κορυφή στα 7.04 ppm η οποία ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια των θέσεων 2 και 6 του γαλλικού οξέος.

Ο μεταβολίτης απομονώνεται πρώτη φορά από το είδος *Paeonia parnassica*. Έχει προηγουμένως απομονωθεί από τα είδη *P. suffruticosa* (φλοιός ρίζας), *P. lactiflora* (ρίζα), *P. anomala* (ρίζα) και *P. decora* (φύλλα, άνθη). Γενικότερα η ουσία παραλαμβάνεται από το φλοιό φρούτων, τα σπέρματα, το βλαστό, τους καρπούς, τα φύλλα, τον κορμό και άλλα φυτικά μέρη, ενώ συνήθως απαντάται σε μεθανολικά, αιθανολικά και υδατικά εκχυλίσματα. Είναι αρκετά διαδεδομένος μεταβολίτης σε πολλά φυτικά είδη όπως *Allanblackia floribunda* (Clusiaceae), *Garcinia densivenia* (Clusiaceae), *Bridelia micrantha* (Phyllanthaceae), *Caesalpinia sappan* (Leguminosae), *Dillenia indica* (Dilleniaceae), *Diospyros cinnabarina* (Ebenaceae), *Paratecoma peroba* (Bignoniaceae), *Psidium guajava* (Myrtaceae), *Syzygium* spp. (Myrtaceae), *Rhus typhina* (Anacardiaceae), *Tamarix nilotica* (Tamaricaceae), *Vitis vinifera* (Vitaceae), *Hamamelis virginiana* (Hamamelidaceae), *Toona sinensis* (Meliaceae), *Oenothera biennis* (Onagraceae) και *Rubus suavissimus* (Rosaceae)⁴⁹⁵. Έχει επιδείξει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση σε πληθώρα δοκιμασιών καθώς φέρει τρεις υδροξυλομάδες οι οποίες μπορούν να λειτουργήσουν ως δότες υδρογόνου για την εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών⁴⁹⁶. Έχει δοκιμαστεί σε πολλούς βιολογικούς στόχους

παρουσιάζοντας δράση ανασταλτική του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, αντιογκογόνο⁴⁹⁷, αντιαγγειογενετική, βακτηριοστατική, κατά της τυροσινάσης και μελανογένεσης⁴⁹⁸, κατά του ιού HSV-2 (*Herpes simplex virus*), αντιμικροβιακή κατά στελεχών ανθεκτικών στη μεθικιλίνη των ειδών *Staphylococcus aureus* και *Helicobacter pylori*, αντιφλεγμονώδη, αντικαταθλιπτική, αντιπαρκινσονική, αντιδιαβητική, διουρητική, καρδιοπροστατευτική, επουλωτική, ενώ έχει αποδειχτεί ότι συμβάλλει στην αντιμετώπιση καρδιαγγειακών και νευροεκφυλιστικών νοσημάτων⁴⁹⁹. Όσον αφορά την αντικαρκινική δράση της ουσίας, έχει δειχθεί ότι περιορίζει τη βιωσιμότητα, τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την αγγειογένεση κυττάρων ανθρώπινου γλοιώματος, αναστέλλει την ανάπτυξη των HeLa κυττάρων καρκίνου του τραχήλου μέσω απόπτωσης και αναστέλλει τα ένζυμα ριβονουκλεοτιδική ρεδοκτάση και κυκλοοξυγενάση σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προμυελωκυτταρικής λευχαιμίας HL-60⁴⁹⁹. Επίσης, εμφανίζει *in vivo* ηπατοπροστατευτική δράση σε μύες με ηπατική βλάβη που προκαλείται από παρακεταμόλη, σε ηπατική ισχαιμία, σε οξεία βλάβη ήπατος που επάγεται από τετραχλωράνθρακα σε επίμυες⁴⁹⁹. Τέλος, στη βιβλιογραφία αναφέρεται ως ισχυρός αναστολέας της α-γλυκοσιδάσης ($IC_{50}=4.7 \mu M$)⁵⁰⁰, μέτριος αναστολέας της AChE (σε συγκέντρωση 100 $\mu g/mL$ προκαλεί $67.26 \pm 1.21\%$ αναστολή⁴⁴²), ενώ δεν έχει επιδείξει αξιοσημείωτη αναστολή της υαλουρονιδάσης¹¹⁴.

Ο μεταβολίτης P13 ταυτοποιήθηκε ως ο 3-O-β-D-γλυκοκυρανοσίδης της καιμπφερόλης (αστραγαλίνη). Πρόκειται για μια γλυκοζυλιωμένη φλαβονόλη με μοριακό βάρος 448.38 g/mol. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας (¹H, COSY, HSQC-DEPT, HMBC) συγκρίθηκαν και επιβεβαιώθηκαν από τη βιβλιογραφία⁵⁰¹.



Πίνακας 95. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 3-Ο-β-D-γλυκοκυρανοσίδης της καιμπερόλης (αστραγαλίνης) (MeOD, 600 MHz)

Θέση	¹ H-NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]	¹³ C
2	-	160.00
3	-	133.91
4	-	179.50
4a	-	104.10
5	-	163.10
6	6.24 (1H, d, J = 1.6 Hz)	100.65
7	-	166.20
8	6.44 (1H, d, J = 1.6 Hz)	95.52
8a	-	156.89
1'	-	121.27
2'/6'	8.08 (2H, d, J = 8.9 Hz)	132.78
3'/5'	6.91 (2H, d, J = 8.9 Hz)	116.64
4'	-	157.85
1''	5.29 (1H, d, J = 7.2 Hz)	104.71
2''	3.46 (1H, m)*	76.15
3''	3.44 (1H, m)*	79.15
4''	3.31 (1H, m)*	71.94
5''	3.22 (1H, ddd, J = 9.7/5.7/2.4 Hz)	78.80
6''	(a) 3.72 (1H, dd, J = 11.8/2.4 Hz) (b) 3.56 (1H, dd, J = 11.8/5.7 Hz)	63.38

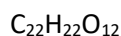
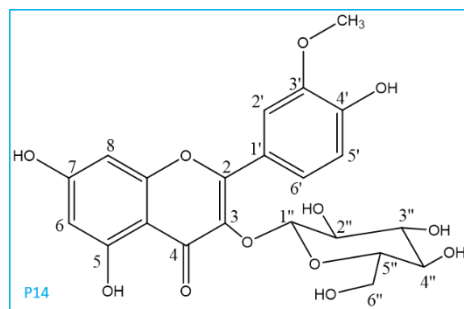
*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη σημάτων

Στο φάσμα ¹H-NMR εντοπίζεται ένα σύστημα A₂B₂ με δύο διπλές κορυφές στα 8.08 ppm (H-2'/H-6') και στα 6.91 ppm (H-3'/H-5') με σταθερές σύζευξης 8.9 Hz που καθεμία ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια. Τα σήματα αυτά είναι χαρακτηριστικά ενός *para* υποκατεστημένου αρωματικού συστήματος. Επίσης, παρατηρούνται οι δύο χαρακτηριστικές διπλές κορυφές των πρωτονίων των θέσεων 8 και 6 μίας 3-Ο-γλυκοζυλιωμένης φλαβονόλης στα 6.44 ppm και 6.24 ppm αντίστοιχα, με σταθερά σύζευξης 1.6 Hz και ολοκλήρωση για ένα πρωτόνιο καθεμία. Στα 5.29 ppm υπάρχει η διπλή κορυφή (J = 7.2 Hz) του ανωμερικού πρωτονίου της γλυκόζης. Οι υπόλοιπες κορυφές του σακχάρου εντοπίζονται στα 3.72-3.22 ppm. Τα σήματα των ανθράκων των θέσεων 2'/6' και 3'/5' παρατηρούνται αντίστοιχα στα 132.78 ppm και 116.64 ppm. Οι άνθρακες των θέσεων 6 και 8 εντοπίζονται στα 100.65 ppm και 95.52 ppm. Τέλος, ο ανωμερικός άνθρακας της γλυκόζης εμφανίζεται στα 104.71 ppm.

Η ουσία απομονώνεται πρώτη φορά από το είδος *Paeonia parnassica*, ενώ έχει απομονωθεί ξανά από τα άνθη της *P. suffruticosa* και τα πέταλα της *P. lactiflora*³⁷⁸. Αποτελεί ένα

συχνά απαντώμενο γλυκοζυλιωμένο φλαβονοειδές στη φύση και εντοπίζεται σε είδη της οικογένειας Rosaceae π.χ. στα φύλλα των *Potentilla parvifolia*, *Potentilla inclinata*⁵⁰² και στα φύλλα του *Prunus dulcis*⁵⁰³, στα φύλλα του *Morus alba*⁵⁰⁴ (Moraceae), στο *Portulaca oleracea* (Portulacaceae)⁵⁰⁵, στα φύλλα του *Ruta graveolens* (Rutaceae)⁵⁰⁶, στα φύλλα του *Phyllanthus urinaria* (Euphorbiaceae)⁵⁰⁷, στα σπέρματα του *Brassica napus* (Brassicaceae)⁵⁰⁸, στα άνθη του *Nerium oleander* (Apoecynaceae)⁵⁰⁹, σε ολόκληρο το φυτό του *Sedum bulbiferum* (Crassulaceae)⁵¹⁰, στο *Helichrysum italicum* (Compositae)⁵¹¹, στο *Camellia nitidissima* (Theaceae)⁵¹² και σε άλλα. Έχει επιδείξει σημαντική αντιοξειδωτική⁵¹³ και αντιφλεγμονώδη⁵¹⁴ δράση μέσω διαφόρων μονοπατιών, μικρή ικανότητα αναστολής της τυροσινάσης μανιταριού⁵¹⁵ και της υαλουρονιδάσης⁵¹⁶, αξιοσημείωτη αναστολή της α-γλυκοσιδάσης⁵⁰² και μέτρια δράση κατά του ιού της γρίπης μέσω αναστολής της νευραμινιδάσης του ιού⁵¹⁷.

Ο μεταβολίτης P14 ταυτοποιήθηκε ως ο 3-O-β-D-γλυκοκυρανοσίδης της ισοραμετινής (MW=478.409 g/mol). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας (¹H, COSY, HSQC-DEPT, HMBC) συγκρίθηκαν και επιβεβαιώθηκαν από τη βιβλιογραφία⁵¹⁸.



Πίνακας 96. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 3-O-β-D-γλυκοκυρανοσίδη της ισοραμετινής (MeOD, 600 MHz)

Θέση	¹ H-NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]	¹³ C
2	-	160.00
3	-	133.91
4	-	179.50
4a	-	104.10
5	-	163.10
6	6.24 (1H, d, J = 1.6 Hz)	100.65
7	-	166.20
8	6.44 (1H, d, J = 1.6 Hz)	95.52
8a	-	156.89
1'	-	123.20

2'	7.95 (1H, d, $J = 1.7$ Hz)		114.93
3'	-		147.31
4'	-		151.10
5'	6.94 (1H, d, $J = 8.4$ Hz)		116.75
6'	7.62 (1H, dd, $J = 8.4/1.7$ Hz)		124.43
CH ₃ O-	3.97 (3H, s)		57.34
1''	5.42 (1H, d, $J = 7.5$ Hz)		104.08
2''	3.49 (1H, m)*		76.15
3''	3.44 (1H, m)*		79.15
4''	3.30 (1H, m)*		71.94
5''	3.24 (1H, m)*		78.80
6''	(a) 3.75 (1H, dd, $J = 12.1/2.4$ Hz)	(b) 3.58 (1H, dd, $J = 12.1/5.7$ Hz)	63.38

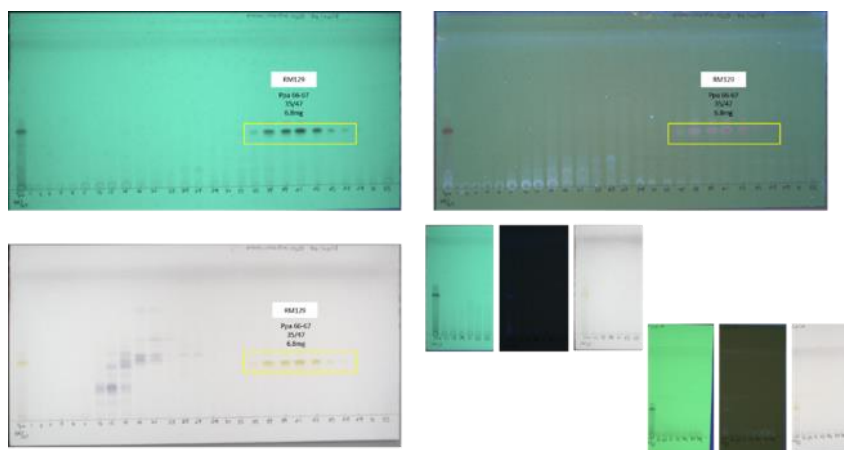
* Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη σημάτων

Στο φάσμα ¹H-NMR παρατηρείται ένα ABX σύστημα με τις τρεις κορυφές των θέσεων 2', 6' και 5' να εντοπίζονται στα 7.95, 7.62 και 6.94 ppm ως διπλή με σταθερά σύζευξης 1.7 Hz, διπλή διπλών με σταθερές σύζευξης 8.4/1.7 Hz και διπλή με σταθερά σύζευξης 8.4 Hz, αντίστοιχα. Επίσης παρατηρούνται οι δύο χαρακτηριστικές διπλές κορυφές των πρωτονίων των θέσεων 8 και 6 μίας 3-Ο-γλυκοζυλιωμένης φλαβονόλης στα 6.44 ppm και 6.24 ppm αντίστοιχα, με σταθερά σύζευξης 1.6 Hz και ολοκλήρωση για ένα πρωτόνιο καθεμία. Στα 5.42 ppm υπάρχει η διπλή κορυφή, με σταθερά σύζευξης 7.5 Hz, του ανωμερικού πρωτονίου της γλυκόζης. Οι υπόλοιπες κορυφές του σακχάρου εντοπίζονται στα 3.75-3.24 ppm. Στα 3.97 ppm υπάρχει η απλή κορυφή της μεθοξυλομάδας που συνδέεται στη θέση 3' του μορίου. Τα σήματα των ανθράκων των θέσεων 2', 6' και 5' παρατηρούνται αντίστοιχα στα 114.93 ppm, 124.43 ppm και 116.75 ppm. Οι άνθρακες των πρωτονίων των θέσεων 6 και 8 εντοπίζονται στα 100.41 ppm και 95.29 ppm. Ο άνθρακας του ανωμερικού πρωτονίου της γλυκόζης εμφανίζεται στα 104.08 ppm. Τέλος, το σήμα του άνθρακα της μεθοξυλομάδας παρατηρείται στα 57.34 ppm.

Η ουσία απομονώνεται πρώτη φορά από το είδος *Paeonia parnassica*, ενώ υπάρχει μια βιβλιογραφική αναφορά ανίχνευσης του μεταβολίτη στα κίτρινα άνθη του δέντρου κινέζικης παιώνιας (Section *Moutan*)⁴⁴⁵. Γενικότερα έχει παραληφθεί από εκχυλίσματα ολόκληρου του φυτού *Sedum sarmentosum* (Crassulaceae)⁵¹⁹, των ανθέων του *Syzygium aromaticum* (Myrtaceae)⁵²⁰, των ανθέων του *Chrysanthemum indicum* (Compositae)⁵²¹, του *Prunus amygdalus* (Rosaceae)⁵²² κ.ά. Έχει επιδείξει ενδιαφέρουσες *in vitro* δράσεις όπως αντιοξειδωτική⁵²², αντιφλεγμονώδη⁵²³, ανοσοδιεγερτική⁵²⁴, αντιμικροβιακή⁵²⁵, αντιπρωτοζωική⁵²⁶, αντιαμωρραγική⁵²⁷, κυτταροτοξική⁵²⁸ σε κυτταρικές σειρές όπως HT-29, A-549⁵²⁹, HL-60 και

αντιπηκτική. Τέλος, σε *in vivo* μελέτες που πραγματοποιήθηκαν μετά από απομόνωση του μεταβολίτη από τα φύλλα του είδους *Sambucus ebulus* (Adoxaceae), αποδείχτηκε η αντιελκωτική κατά των πεπτικών ελκών δράση⁵³⁰, ενώ ο μεταβολίτης P14 εμφάνισε αξιοσημείωτη αντιδιαβητική δράση σε μύες μετά την απομόνωσή του από το είδος *Salicornia herbacea* (Amaranthaceae)⁵³¹.

Κλάσμα Ppa FR.37: 40.6 mg του κλάσματος υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με στατική φάση sephadex LH-20 και κινητή φάση MeOH:H₂O 85:15.



Εικόνα 203. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας των κλασμάτων της sephadex στο κλάσμα Ppa FR.37. Σύστημα ανάπτυξης EtOAc/MeOH/H₂O 50/10/7

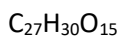
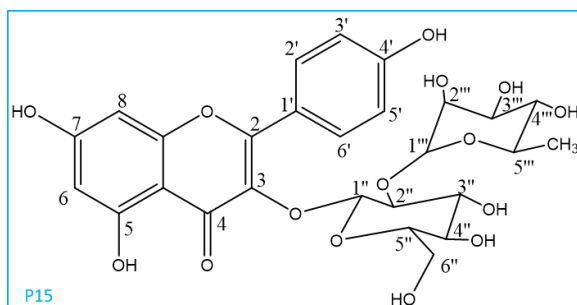
Συνολικά παρελήφθησαν 80 κλάσματα όγκου 500 μL το καθένα, από τα οποία 1 συνενωμένο κλάσμα ελέγχθηκε ως προς το περιεχόμενό του με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

Πίνακας 97. Συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν από τη sephadex του κλάσματος Ppa FR.37

Κωδικός κλάσματος	Κωδικός NMR	Βάρος δείγματος (mg)
Ppa 66-67 35/47	RM129	6.8

Στο κλάσμα RM129 παραλήφθηκε ο 3-Ο-νεοεσπεριδοσίδης της καμπφερόλης (Μεταβολίτης P15).

Ο μεταβολίτης P15 ταυτοποιήθηκε ως ο 3-Ο-νεοεσπεριδοσίδης της καμπφερόλης (καμπφερολο-3-Ο-(2''-Ο-α-L-ραμνοπυρανοσυλο)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης) (MW=594.522 g/mol). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας (¹H, COSY, HSQC-DEPT, HMBC) συγκρίθηκαν και επιβεβαιώθηκαν από τη βιβλιογραφία^{532 533}.



Πίνακας 98. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 3-O-νεοεσπεριδοσίδης της καμπφερόλης (MeOD, 600 MHz)

Θέση	$^1\text{H-NMR}$ [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]	^{13}C
2	-	159.91
3	-	130.86
4	-	178.02
4a	-	104.26
5	-	161.65
6	6.21 (1H, d, $J = 2.1$ Hz)	100.17
7	-	164.20
8	6.41 (1H, d, $J = 2.1$ Hz)	95.42
8a	-	157.07
1'	-	121.61
2'/6'	8.05 (2H, d, $J = 8.9$ Hz)	132.46
3'/5'	6.89 (2H, d, $J = 8.9$ Hz)	116.83
4'	-	159.87
1''	5.74 (1H, d, $J = 7.7$ Hz)	100.68
2''	3.63 (1H, m)*	79.73
3''	3.59 (1H, m)*	78.10
4''	3.31 (1H, m)*	73.42
5''	3.26 (1H, m)(78.17
6''	(a) 3.76 (1H, dd, $J = 11.6/2.5$ Hz) (b) 3.53 (1H, dd, $J = 11.6/5.7$ Hz)	63.15
1'''	5.22 (1H, s)	102.80
2'''	4.03 (1H, m)*	71.24
3'''	3.79 (1H, m)*	71.24
4'''	4.03 (1H, m)*	73.07
5'''	3.79 (1H, m)*	69.41

6'''	0.93 (3H, d, $J = 6.2$ Hz)	18.74
------	----------------------------	-------

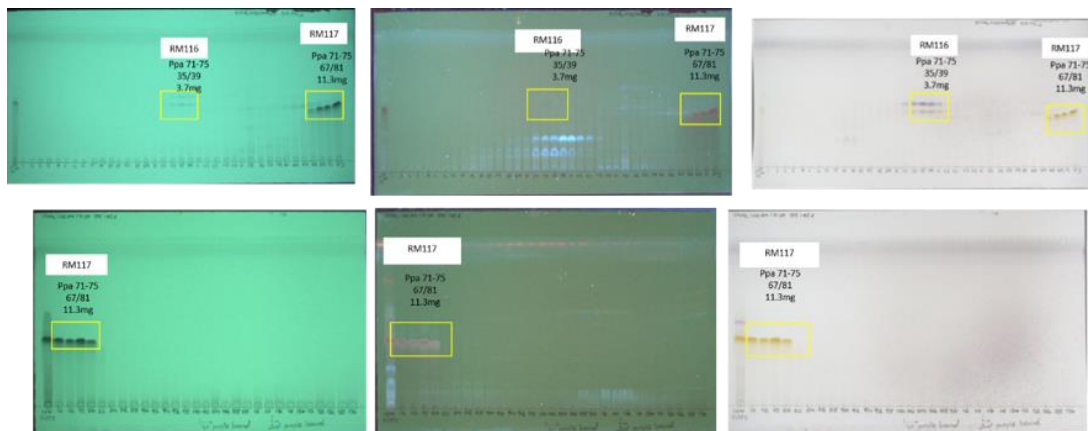
*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη σημάτων

Αποτελεί έναν 3-*O*-δισακχαρίτη φλαβονόλης. Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ εντοπίζονται τα εξής: α) A_2B_2 σύστημα με χαρακτηριστικές δύο διπλές κορυφές, σταθεράς σύζευξης 8.9 Hz και ολοκλήρωσης 2 πρωτονίων καθεμία, στα 8.05 ppm (H-2'/H-6') και 6.89 ppm (H-3'/H-5'), β) δύο διπλές κορυφές στα 6.41 ppm και 6.21 ppm με σταθερά σύζευξης 2.1 Hz που αντιστοιχούν στα πρωτόνια των θέσεων 8 και 6 Α δακτυλίου 3-*O*-γλυκοζυλιωμένης φλαβονόλης, γ) δύο κορυφές στα 5.74 ppm (d, $J = 7.7$ Hz) και 5.22 ppm (s) που αντιστοιχούν στα δύο ανωμερικά πρωτόνια του δισακχαρίτη του νεοεσπεριδοσίδη (α -L-ραμνοπυρανοσυλο-(1->2)- β -D-γλυκοπυρανοσίδης) που συνδέεται στο OH της θέσης 3 του C δακτυλίου και δ) διπλή κορυφή ($J = 6.2$ Hz) στα 0.93 ppm που ολοκληρώνει για 3 πρωτόνια και αντιστοιχεί στο μεθύλιο της ραμνόζης. Η παρατήρηση του σήματος του ^{13}C της θέσης 1'' της γλυκόζης σε μικρότερη χημική μετατόπιση (100.68 ppm) και η αποθωράκιση του ^{13}C της θέσης 2'' της γλυκόζης (79.73 ppm) σε σύγκριση με τον 3-*O*-γλυκοσίδη της καιμπερόλης φανερώνει τη σύνδεση δεύτερου σακχάρου και συγκεκριμένα της ραμνόζης στη θέση 2'' της γλυκόζης.

Η ουσία απομονώνεται πρώτη φορά από το είδος *Paeonia parnassica*, δεν υπάρχει βιβλιογραφική αναφορά για την ύπαρξη του μεταβολίτη στην οικογένεια, ενώ οι νεοεσπεριδοσίδες που απαντώνται συχνότερα στο γένος είναι ο 7-*O*-νεοεσπεριδοσίδης της απιγενίνης, της χρυσοεριόλης και της λουτεολίνης. Γενικότερα απομονώνεται από φυτικά είδη διαφόρων οικογενειών και ενδεικτικά αναφέρονται τα είδη *Clitoria ternatea* (Fabaceae)⁵³⁴, *Allium ursinum* (Amaryllidaceae)⁵³⁵, *Cyathea phalerata* (Cyatheaceae)⁵³⁶, *Daphniphyllum calycinum* (Daphniphyllaceae)¹⁸⁹, *Ficus pandurata* (Moraceae)⁵³⁷. Σε μελέτες που διεξήχθησαν σε κύτταρα μελανώματος B16F10 μυών, ο συγκεκριμένος μεταβολίτης που απομονώθηκε από το γένος *Citrus* μείωσε τη δράση της τυροσινάσης και κατά συνέπεια τη διαδικασία της μελανογένεσης⁵³⁸. Επίσης, σε *in vivo* μελέτη που έγινε σε διαβητικούς μύες⁵³⁶, έχει αποδειχτεί ότι ο 3-*O*-νεοεσπεριδοσίδης της καιμπερόλης εμφανίζει δράση κατά του σακχαρώδους διαβήτη μιμούμενος την ινσουλίνη. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που φαίνεται να εμπλέκονται σε αυτή τη δράση είναι τα PI3K-GSK-3 (phosphatidylinositol 3-kinase, glycogen synthase kinase 3) και MAPK-PPI (mitogen-activated protein kinase, protein phosphatase 1)⁵³⁹. Σε μεταγενέστερη μελέτη, όπου συντέθηκαν ανάλογα της ουσίας και δοκιμάστηκαν για την ικανότητα διατήρησης της ομοιόστασης της γλυκόζης σε κυτταρική σειρά μυών L6 (μυϊκή), αποδείχθηκε ότι το σακχαριδικό τμήμα του μορίου είναι υπεύθυνο για την ινσουλινομιμητική του δράση⁵⁴⁰. Πιο

συγκεκριμένα, διεγείρει την πρόσληψη της γλυκόζης και την παραγωγή γλυκογόνου. Αποτελεί μέτριο αναστολέα της ελεύθερης ρίζας του DPPH, όπως αποδείχτηκε σε μελέτη στην οποία είχε προηγηθεί απομόνωσή του από ολόκληρο το φυτό του *Mallotus metcalfianus* (Euphorbiaceae) ^{541 542}. Αυξάνει τη σύνθεση του κολλαγόνου και διεγείρει τη δράση οστεοβλαστών MC3T3-E1 και τη δημιουργία οστού⁵³², συνεπώς θα μπορούσε να αποτελέσει θεραπευτικό παράγοντα για την πρόληψη και αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης. Σε δοκιμές κυτταροτοξικότητας, όπως σε κύτταρα HeLa, δεν εμφάνισε αξιοσημείωτη δράση⁵³³.

Pρα FR.39-40: 52.1 mg του κλάσματος υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με στατική φάση sephadex LH-20 και κινητή φάση MeOH:H₂O 85:15.



Εικόνα 204. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας των κλασμάτων της sephadex στα κλάσματα Ppra FR.39-40. Σύστημα ανάπτυξης EtOAc/MeOH/H₂O 50/10/7

Συνολικά παρελήφθησαν 130 κλάσματα όγκου 500 μL το καθένα, από τα οποία 2 συνενωμένα κλάσματα ελέγχθησαν για το χημικό τους φορτίο με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

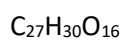
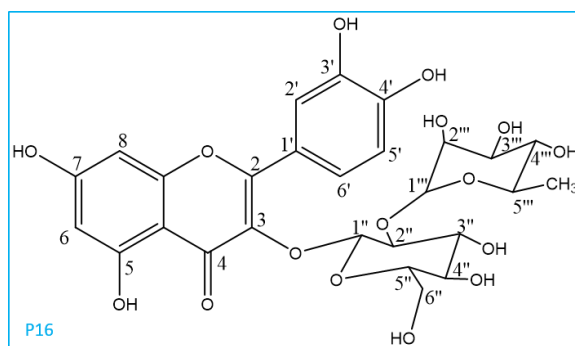
Πίνακας 99. Συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν από τη sephadex των κλασμάτων Ppra FR.39-40

Κωδικός κλάσματος	Κωδικός NMR	Βάρος δείγματος (mg)
Ppra 71-75 35/39	RM116	3.7
Ppra 71-75 67/81	RM117	11.3

Στο κλάσμα RM117 παραλήφθηκε ο 3-Ο-νεοεσπεριδοσίδης της κερκετίνης (Μεταβολίτης P16).

Ο μεταβολίτης P16 ταυτοποιήθηκε ως ο 3-Ο-νεοεσπεριδοσίδης της κερκετίνης (κερκετινο-3-Ο-(2''-Ο-α-L-ραμνοπυρανοσυλο)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης) (MW=610.521 g/mol). Τα

φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας ($^1\text{H-NMR}$) συγκρίθηκαν και επιβεβαιώθηκαν από τη βιβλιογραφία^{450 543}.



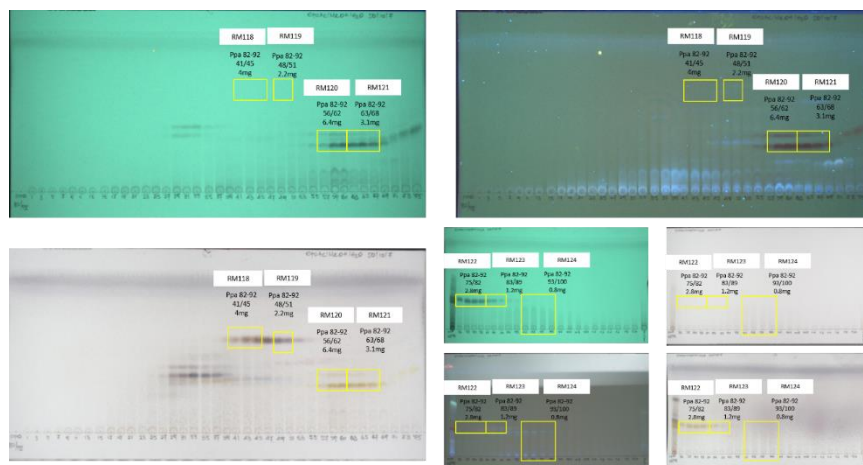
Πίνακας 100. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 3-O-νεοεσπεριδοσίδη της κερκετίνης (MeOD, 400 MHz)

Θέση	$^1\text{H-NMR}$ [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]	
6	6.17 (1H, d, $J = 2.0$ Hz)	
8	6.36 (1H, d, $J = 2.0$ Hz)	
2'	7.62 (1H, d, $J = 1.4$ Hz)	
5'	6.86 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)	
6'	7.60 (1H, dd, $J = 8.0/1.4$ Hz)	
1''	5.76 (1H, d, $J = 7.5$ Hz)	
2''	3.65 (1H, dd, $J = 9.4/7.5$ Hz)	
3''	3.55 (1H, t, $J = 9.4$ Hz)	
4''	3.33 (1H, t, $J = 9.4$ Hz)	
5''	3.22 (1H, ddd, $J = 9.4/5.6/2.3$ Hz)	
6''	(a) 3.72 (1H, dd, $J = 12.1/2.3$ Hz)	(b) 3.54 (1H, dd, $J = 12.1/5.6$ Hz)
1'''	5.22 (1H, s)	
2'''	4.02 (1H, d, $J = 3.4$ Hz)	
3'''	3.77 (1H, dd, $J = 9.6/3.4$ Hz)	
4'''	4.04 (1H, m)	
5'''	3.35 (1H, m)	
6'''	0.96 (3H, d, $J = 6.2$ Hz)	

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ εντοπίζονται τα εξής: α) ABX σύστημα με τα πρωτόνια των θέσεων 2', 6' και 5' του δακτυλίου Β να εμφανίζονται στα 7.62 ppm, 7.60 ppm και 6.86 ppm, ως διπλή ($J = 1.4 \text{ Hz}$), διπλή διπλών ($J = 8.0/1.4 \text{ Hz}$) και διπλή ($J = 8.0 \text{ Hz}$) κορυφή, β) δύο διπλές κορυφές στα 6.36 ppm και 6.17 ppm, με σταθερά σύζευξης 2.0 Hz, που αντιστοιχούν στα πρωτόνια των θέσεων 8 και 6 του δακτυλίου Α της 3-Ο-γλυκοζυλιωμένης φλαβονόλης, γ) δύο κορυφές στα 5.76 ppm (d, $J = 7.5 \text{ Hz}$) και 5.22 ppm (s) που αντιστοιχούν στα ανωμερικά πρωτόνια του νεοεσπεριδοσίδη (α-L-ραμνοπυρανοσουλ-(1->2)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης) που συνδέεται στο ΟΗ της θέσης 3 του C δακτυλίου του φλαβονοειδούς και δ) διπλή κορυφή ($J = 6.2 \text{ Hz}$) στα 0.96 ppm που ολοκληρώνει για 3 πρωτόνια και αντιστοιχεί στο μεθύλιο της ραμνόζης.

Η ουσία ανήκει στην κατηγορία φλαβονολών που φέρουν δισακχαρίτη στο ΟΗ της θέσης 3. Ο μεταβολίτης απομονώνεται πρώτη φορά από την οικογένεια Ραεοπιάσεία. Έχει παραληφθεί από το μεθανολικό εκχύλισμα ολόκληρου του κινεζικού είδους *Mallotus metcalfianus* (Euphorbiaceae), όπου επέδειξε ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση από τον 3-Ο-νεοεσπεριδοσίδη της καιμπερόλης, αλλά ασθενέστερη σε σχέση με το ρουτινοσίδη της κερκετίνης⁵⁴¹. Η αντιοξειδωτική δράση του μεταβολίτη επιβεβαιώνεται και σε άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε μετά από παραλαβή του από τους καρπούς και τα φύλλα του είδους *Melia azedarach* (Meliaceae)⁵⁴⁴. Επίσης έχει απομονωθεί από το αιθανολικό εκχύλισμα ανθέων κινεζικού είδους *Trollius ledebouri* (Ranunculaceae)⁵⁴⁵, από τα φύλλα του είδους *Prunus serotina* (Rosaceae)⁵⁴⁶, από τη γύρη του είδους *Echium plantagineum* (Boraginaceae)⁵⁴⁷ και από το είδος *Humulus lupulus* (Cannabaceae)⁵⁴⁸. Ο 3-Ο-νεοεσπεριδοσίδης της κερκετίνης που απομονώθηκε από το μεθανολικό εκχύλισμα των φύλλων του τροπικού είδους *Costus spicatus* (Costaceae) επέδειξε μέτρια ικανότητα αναστολής της παραγωγής του ΝΟ και αντιφλεγμονώδη δράση⁵⁴⁹.

Ppa FR.45-48: 78.3 mg του κλάσματος υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με στατική φάση sephadex LH-20 και κινητή φάση MeOH:H₂O 85:15.



Εικόνα 205. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας των κλασμάτων της *spheradex* στα κλάσματα Ppa FR.45-48. Σύστημα ανάπτυξης EtOAc/MeOH/H₂O 50/10/7

Συνολικά παρελήφθησαν 120 κλάσματα, όγκου 500 μ L το καθένα, από τα οποία 7 συνενωμένα κλάσματα ελέγχθησαν για το χημικό τους φορτίο με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

Πίνακας 101. Συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν από τη *spheradex* των κλασμάτων Ppa FR.45-48

Κωδικός κλάσματος	Κωδικός NMR	Βάρος δείγματος (mg)
Ppa 82-92 41/45	RM118	4.0
Ppa 82-92 48/51	RM119	2.2
Ppa 82-92 56/62	RM120	6.4
Ppa 82-92 63/68	RM121	3.1
Ppa 82-92 75/82	RM122	2.8
Ppa 82-92 83/89	RM123	1.2
Ppa 82-92 93/100	RM124	0.8

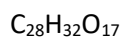
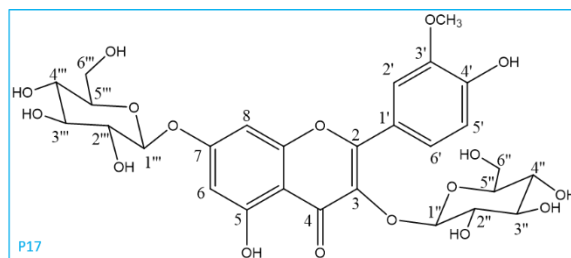
Στο κλάσμα RM121 παραλήφθηκε ο μεταβολίτης **P11** (3-*O*-σοφοροσίδης της λιμοσιτρίνης).

Στο κλάσμα RM122 παραλήφθηκε ο 3,7-*O*- β -D-διγλυκοσίδης της ισοραμνετίνης (Μεταβολίτης **P17**) σε μείγμα με τον 3,7-*O*- β -D-διγλυκοσίδης της καμπφερόλης (Μεταβολίτης **P18**).

Στο κλάσμα RM123 παραλήφθηκε ο 3,7-*O*- β -D-διγλυκοσίδης της καμπφερόλης (Μεταβολίτης **P18**).

Στο κλάσμα RM124 παραλήφθηκε ο 3,7-*O*- β -D-διγλυκοσίδης της κερκετίνης (Μεταβολίτης **P19**).

Ο μεταβολίτης **P17** ταυτοποιήθηκε ως 3-Ο-β-D-γλυκοκυρανοσυλο-7-Ο-β-D-γλυκοκυρανοσίδης της ισοραμνετίνης (MW=640.547 g/mol). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας (¹H, COSY, HMBC, HSQC-DEPT) συγκρίθηκαν και επιβεβαιώθηκαν από τη βιβλιογραφία⁵⁵⁰.



Πίνακας 102. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 3,7-Ο-β-D-διγλυκοσίδης της ισοραμνετίνης (MeOD, 600 MHz)

Θέση	¹ H-NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]	¹³ C
2	-	155.97
3	-	133.41
4	-	177.60
4a	-	105.60
5	-	160.81
6	6.52 (1H, d, J = 2.1 Hz)	101.20
7	-	162.77
8	6.82 (1H, d, J = 2.1 Hz)	96.28
8a	-	155.97
1'	-	120.73
2'	8.03 (1H, d, J = 2.0 Hz)	114.97
3'	-	149.50
4'	-	153.0
5'	6.93 (1H, d, J = 8.4 Hz)	117.10
6'	7.66 (1H, dd, J = 8.4/2.0 Hz)	124.60
CH₃O-3'	3.99 (3H, s)	57.90
1''	5.32 (1H, d, J = 6.7 Hz)	105.37
2''	3.35-3.95 (1H, m)*	75.96
3''	3.35-3.95 (1H, m)*	75.87

4''	3.35-3.95 (1H, m)*		72.11
5''	3.35-3.95 (1H, m)*		79.05
6''	(a) 3.92 (1H, dd, $J = 12.1/2.3$ Hz)	(b) 3.67 (1H, dd, $J = 12.1/5.6$ Hz)	63.31
1'''	5.09 (1H, d, $J = 6.8$ Hz)		102.44
2'''	3.35-3.95 (1H, m)*		75.96
3'''	3.35-3.95 (1H, m)*		75.87
4'''	3.35-3.95 (1H, m)*		72.11
5'''	3.35-3.95 (1H, m)*		79.05
6'''	(a) 3.73 (1H, dd, $J = 12.1/2.3$ Hz)	(b) 3.65 (1H, dd, $J = 12.1/5.6$ Hz)	63.21

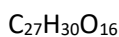
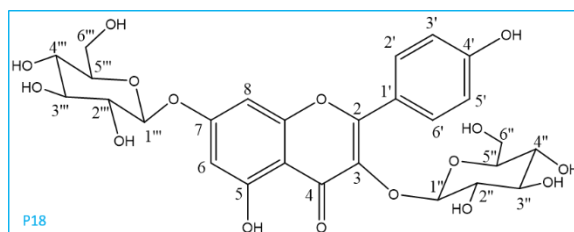
*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη σημάτων

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ εντοπίζονται στα 8.03 ppm, 7.66 ppm και 6.93 ppm οι τρεις χαρακτηριστικές κορυφές των πρωτονίων των θέσεων 2', 6' και 5' ενός ABX συστήματος. Επιπρόσθετα, εμφανίζονται οι δύο διπλές κορυφές των πρωτονίων των θέσεων 6 και 8, οι οποίες όμως είναι αρκετά αποθωρακισμένες, στα 6.52 ppm και 6.82 ppm αντίστοιχα, γεγονός το οποίο δείχνει την ύπαρξη σακχάρου στη θέση 7 του δακτυλίου A, αλλά και δύο διπλές κορυφές ανωμερικών πρωτονίων γλυκόζης στα 5.32 ppm και 5.09 ppm με τα αντίστοιχα σήματα άνθρακα να εμφανίζονται στα 105.37 ppm και 102.44 ppm, βάσει των οποίων συμπεραίνεται τελικά η σύνδεση δύο σακχάρων στις θέσεις 3 και 7 της φλαβονόλης. Επίσης, εντοπίζεται η απλή κορυφή των τριών πρωτονίων της μεθοξυλομάδας της θέσης 4' του δακτυλίου B στα 3.99 ppm με άνθρακα στα 57.90 ppm.

Ο μεταβολίτης απομονώνεται πρώτη φορά από την οικογένεια *Raeoniaceae*. Έχει παραληφθεί από είδη της οικογένειας *Brassicaceae*, όπως είναι τα άνθη του *Brassica rapa*⁵⁵⁰, και τα φύλλα του *Brassica juncea*, επιδεικνύοντας αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική και υπογλυκαιμική δράση σε σακχαρώδη διαβήτη μυών που επάγεται από τη λήψη του κυτταροτοξικού αντιβιοτικού στρεπτοζοτοκίνη, μολονότι τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* πειράματα αποδείχτηκε ότι η γενίνη, ισοραμεντίνη⁵⁵¹ είναι ο βιοδραστικός μεταβολίτης. Επίσης, απομονώθηκε από τα φύλλα του *Brassica campestris*, παρουσιάζοντας αδυναμία αντιμετώπισης βλάβης του ήπατος μυών που προκαλείται από τετραχλωράνθρακα, σε αντίθεση με τον 3-Ο-γλυκοσίδη της ισοραμεντίνης ο οποίος ήταν δραστικός⁵⁵². Τέλος, περισσότερο μελετημένη είναι η ισοραμεντίνη, η οποία έχει απομονωθεί από διάφορα φυτικά είδη και έχει εμφανίσει πληθώρα

βιολογικών δράσεων όπως αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακή, κυτταροτοξική, υπογλυκαιμική, νευροπροστατευτική κ.ά.^{553 554 555}.

Ο μεταβολίτης **P18** ταυτοποιήθηκε ως 3-*O*-β-D-γλυκοκυρανοσυλο-7-*O*-β-D-γλυκοκυρανοσίδης της καμπφερόλης (MW=610.524 g/mol). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας (¹H, COSY, HMBC, HSQC-DEPT) συγκρίθηκαν και επιβεβαιώθηκαν από τη βιβλιογραφία⁵⁵⁶.



Πίνακας 103. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 3,7-*O*-β-D-διγλυκοσίδης της καμπφερόλης (MeOD, 600 MHz)

Θέση	¹ H-NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]	¹³ C
2	-	155.97
3	-	133.41
4	-	177.60
4a	-	105.60
5	-	160.81
6	6.52 (1H, d, J = 2.1 Hz)	101.42
7	-	162.77
8	6.81 (1H, d, J = 2.1 Hz)	96.33
8a	-	155.97
1'	-	120.73
2'/6'	8.13 (2H, d, J = 8.8 Hz)	133.17
3'/5'	6.92 (2H, d, J = 8.8 Hz)	116.89
4'	-	160.30
1''	5.24 (1H, d, J = 6.6 Hz)	104.49
2''	3.35-3.95 (1H, m)*	75.96
3''	3.35-3.95 (1H, m)*	75.87
4''	3.35-3.95 (1H, m)*	72.11

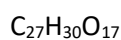
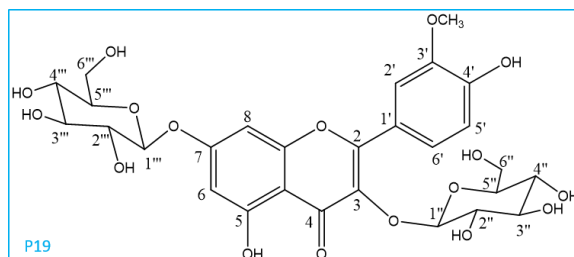
5''	3.35-3.95 (1H, m)*		79.05
6''	(a) 3.92 (1H, dd, $J = 12.1/2.3$ Hz)	(b) 3.67 (1H, dd, $J = 12.1/5.6$ Hz)	63.31
1'''	5.09 (1H, d, $J = 6.9$ Hz)		102.12
2'''	3.35-3.95 (1H, m)*		75.96
3'''	3.35-3.95 (1H, m)*		75.87
4'''	3.35-3.95 (1H, m)*		72.11
5'''	3.35-3.95 (1H, m)*		79.05
6'''	(a) 3.73 (1H, dd, $J = 12.1/2.3$ Hz)	(b) 3.65 (1H, dd, $J = 12.1/5.6$ Hz)	63.21

*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη σημάτων

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ εντοπίζονται οι ίδιες κορυφές με τον παραπάνω μεταβολίτη με διαφορά την ύπαρξη των δύο χαρακτηριστικών διπλών κορυφών σταθεράς σύζευξης 8.8 Hz στα 8.13 ppm και 6.92 ppm, οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια 2',6' και 3',5' ενός A_2B_2 συστήματος (B δακτύλιος).

Ο μεταβολίτης απομονώνεται πρώτη φορά από το είδος *Paeonia parnassica* ενώ έχει παραληφθεί ξανά από άλλα είδη της οικογένειας όπως *P. ostii* (άνθη), *P. lactiflora* (άνθη), *P. suffruticosa* και *P. albiflora* var. *hortensis*³⁷⁸. Επιπλέον έχει εντοπισθεί σε είδη όπως τα *Sedum formosanum* (Crassulaceae)⁵⁵⁶, *Cicer arietinum* (Leguminosae) (σπέρματα)⁵⁵⁷, *Allium ursinum* (Amaryllidaceae) (φύλλα)⁵⁵⁸, *Delphinium staphisagria* (Ranunculaceae) (υπέργεια τμήματα)⁵⁵⁹, *Brassica rapa* (Brassicaceae) (φύλλα)⁵⁶⁰, *Crocus sativus* (Iridaceae) (πέταλα)⁵⁶¹, *Equisetum* spp. (Equisetaceae) (υπέργεια τμήματα)⁵⁶² και *Aristolochia cucurbitifolia* (Aristolochiaceae) (φύλλα)⁵⁶³. Έχει επιδείξει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση σε διάφορες δοκιμασίες όπως εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών ABTS και DPPH⁵⁶⁴, αλλά και ικανότητα παρεμπόδισης του πολλαπλασιασμού του *Trypanosoma cruzi* με χαμηλότερα ποσοστά τοξικότητας έναντι του φαρμάκου αναφοράς (benznidazole)⁵⁵⁹. Έχει παραληφθεί από το φλοιό του καρπού του είδους *Wisteria floribunda* (Leguminosae) και παρουσίασε χαμηλή αντιφλεγμονώδη δράση σε δοκιμασία αναστολής της TNF- α -επαγόμενης NF-kB ενεργοποίησης των HepG2 κυττάρων⁵⁶⁵. Απομονώθηκε από το μεθανολικό εκχύλισμα των ανθέων του *Helichrysum arenarium* (Asteraceae), το οποίο είχε εμφανίσει ικανότητα αναστολής της αύξησης της γλυκόζης στο αίμα διαβητικών μυών, χωρίς όμως η ουσία να παρουσιάσει αξιοσημείωτη δράση έναντι του ενζύμου διπεπτιδυλο-πεπτιδάση-IV (DPP-IV) και συνεπώς αντιδιαβητική δράση⁵⁶⁶.

Ο μεταβολίτης **P19** ταυτοποιήθηκε ως 3-O-β-D-γλυκοκυρανοσυλο-7-O-β-D-γλυκοκυρανοσίδης της κερκετίνης (7-O-β-D-γλυκοκυρανοσυλο-κερκετινο-3-O-β-D-γλυκοκυρανοσίδης) (MW=626.525 g/mol). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας (¹H-NMR) συγκρίθηκαν και επιβεβαιώθηκαν από τη βιβλιογραφία⁵⁶⁷.



Πίνακας 104. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 3,7-O-β-D-διγλυκοσίδη της κερκετίνης (MeOD, 400 MHz)

Θέση	¹ H-NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]	
6	6.52 (1H, d, J = 2.1 Hz)	
8	6.80 (1H, d, J = 2.1 Hz)	
2'	7.79 (1H, d, J = 2.0 Hz)	
5'	6.90 (1H, d, J = 8.6 Hz)	
6'	7.64 (1H, dd, J = 8.6/2.0 Hz)	
1''	5.25 (1H, d, J = 6.6 Hz)	
2''	3.46 (1H, m)*	
3''	3.49-3.57 (1H, m)*	
4''	3.35-3.45 (1H, m)*	
5''	3.35-3.45 (1H, m)*	
6''	(a) 3.68-3.75 (1H, m)*	(b) 3.83-3.95 (1H, m)*
1'''	5.09 (1H, d, J = 6.8 Hz)	
2'''	3.46 (1H, m)*	
3'''	3.49-3.57 (1H, m)*	
4'''	3.35-3.45 (1H, m)*	
5'''	3.35-3.45 (1H, m)*	
6'''	(a) 3.68-3.75 (1H, m)*	(b) 3.83-3.95 (1H, m)*

* Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη σημάτων

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ εντοπίζονται οι ίδιες κορυφές που περιγράφηκαν για τους παραπάνω μεταβολίτες με μόνη διαφορά την ύπαρξη ενός ABX συστήματος στο Β δακτύλιο, κάτι το οποίο γίνεται φανερό από την ανίχνευση μιας διπλής κορυφής σταθεράς σύζευξης 2.0 Hz (H-2') στα 7.79 ppm, μιας διπλής διπλών κορυφής σταθερών σύζευξης 8.6/2.0 Hz (H-6') στα 7.64 ppm και μιας διπλής κορυφής σταθεράς σύζευξης 8.6 Hz (H-5') στα 6.90 ppm.

Η ουσία απομονώνεται πρώτη φορά από το είδος *Paeonia parnassica* ενώ έχει προηγουμένως ανιχνευθεί στα άνθη και στα φύλλα της *P. rockii*⁴³⁴ και στα άνθη του κινεζικού δέντρου παιώνιας (section *Moutan*)⁴⁴⁵. Γενικότερα ο συγκεκριμένος διγλυκοσίδης της κερκετίνης έχει παραληφθεί από είδη όπως *Taraxacum mongolicum* (Compositae) (μεθανολικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων)⁵⁶⁸, *Verbascum caesareum* (Scrophulariaceae) (αιθανολικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων)⁵⁶⁹, *Potentilla anserina* (Rosaceae) (ριζώματα)⁵⁷⁰, *Astragalus bombycinus* (Leguminosae) (υδραλκολικό εκχύλισμα ολόκληρου φυτού)⁵⁷¹ και *Maesa lanceolata* (Primulaceae) (μεθανολικό εκχύλισμα φύλλων)⁵⁷². Επίσης, απομονώθηκε από το αιθανολικό εκχύλισμα ανθέων του *Gossypium herbaceum* (Malvaceae), επιδεικνύοντας αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική και ανασταλτική της AChE δράση, μικρότερης όμως ισχύος συγκριτικά με την αντίστοιχη γενίνη, την κερκετίνη^{573 574}. Παραλήφθηκε από το αιθανολικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων *Abies nephrolepis* (Pinaceae) και παρουσίασε ενδιαφέρουσα αντιφλεγμονώδη δράση σε μακροφάγα RAW264.7⁵⁷⁵. Απομονώθηκε από το μεθανολικό εκχύλισμα ανθέων του *Chrysanthemum indicum* (Asteraceae) και δεν επέδειξε ικανότητα αναστολής της αναγωγής της αλδόζης⁵⁷⁶. Παραλήφθηκε από το μεθανολικό εκχύλισμα των φύλλων του *Morus alba* (Moraceae) και εμφάνισε σημαντική ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης και επαγωγής της διαφοροποίησης των ανθρώπινων κυττάρων προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας (HL-60)⁵⁷⁷. Τέλος, η ουσία παρουσίασε μικρή ικανότητα επαγωγής της μελανογένεσης και της δράσης της τυροσινάσης σε ανθρώπινα B16 κύτταρα μελανώματος⁵⁶⁷.

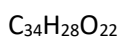
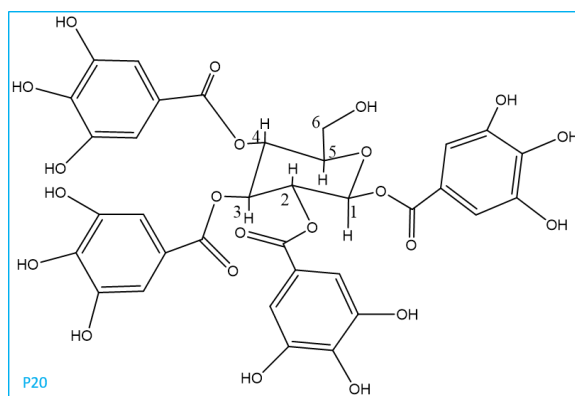
- ❖ Υδατομεθανολικό εκχύλισμα ριζών του είδους *Paeonia parnassica* (Κωδικός εκχυλίσματος: PPRC):

Από την επεξεργασία του ολικού εκχυλίσματος PPRC με FCPC απομονώθηκαν απευθείας οι παρακάτω ουσίες:

1. Μείγμα των δύο διγαλλικών μεθυλεστέρων (Ppr FR.3 και Ppr FR.4) (Μεταβολίτες P2, P3)
2. Γαλλικός μεθυλεστέρας (Ppr FR.6 (καθαρότητα > 90%), Ppr FR.7 (καθαρότητα > 99%), Ppr

- FR8 (καθαρότητα > 90%) (Μεταβολίτης P4)
- 1,2,3,4,6-πεντα-*O*-γαλλοϋλο-β-D-γλυκοκυρανόση (PGG) (Ppr FR.32, Ppr FR.33, Ppr FR.34, Ppr FR.35, Ppr FR.36) (Μεταβολίτης P9)
 - 1,2,3,4-τετρα-*O*-γαλλοϋλο-β-D-γλυκοκυρανόση (Ppr FR.39) (Μεταβολίτης P20)
 - Παιωνιφλορίνη (Ppr FR.48, Ppr FR.49, Ppr FR.50, Ppr FR.51, Ppr FR.52, Ppr FR.53, Ppr FR.54, Ppr FR.55, Ppr FR.56) (Μεταβολίτης P21)
 - Αλμπιφλορίνη (Ppr FR.58, Ppr FR.59, Ppr FR.60) (Μεταβολίτης P22)

Ο μεταβολίτης P20 ταυτοποιήθηκε ως ο 1,2,3,4-τετρα-*O*-γαλλοϋλο-β-D-γλυκοκυρανοσίδης (MW=788.576 g/mol). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας (¹H-NMR) συγκρίθηκαν και επιβεβαιώθηκαν από δεδομένα της βιβλιογραφίας⁵⁷⁸.



Πίνακας 105. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 1,2,3,4-τετρα-*O*-γαλλοϋλο-β-D-γλυκοκυρανοσίδης (MeOD, 600 MHz)

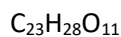
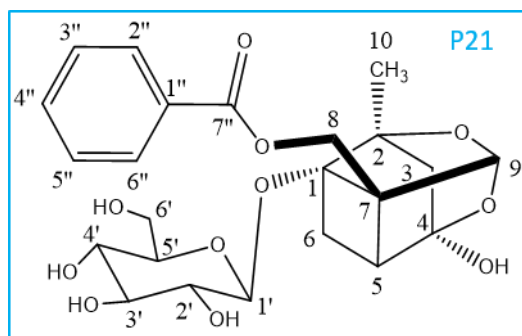
Θέση	¹ H-NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]	
1	6.21 (1H, d, J = 8.3 Hz)	
2	5.59 (1H, dd, J = 9.6/8.3 Hz)	
3	5.88 (1H, t, J = 9.6 Hz)	
4	5.51 (1H, t, J = 9.6 Hz)	
5	4.09 (1H, m)	
6	(a) 3.80 (1H, dd, J = 13.0/2.2 Hz)	(b) 3.68 (1H, dd, J = 13.0/4.9 Hz)
2',6'(gallic acid)	7.07 (2H, s)	
2',6'(gallic acid)	7.01 (2H, s)	
2',6'(gallic acid)	6.96 (2H, s)	

2',6'(gallic acid)	6.93 (2H, s)
--------------------	--------------

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ εντοπίζονται τέσσερις απλές κορυφές στα 7.07, 7.01, 6.96 και 6.93 ppm, οι οποίες ολοκληρώνουν για δύο πρωτόνια καθεμία και αντιστοιχούν στα πρωτόνια των τεσσάρων μονάδων του γαλλικού οξέος που συνδέονται στις θέσεις 1, 2, 3 και 4 μιας γλυκόζης. Η κορυφή του ανωμερικού πρωτονίου της γλυκόζης, η οποία είναι αρκετά αποθωρακισμένη, εντοπίζεται στα 6.21 ppm ως διπλή με σταθερά σύζευξης 8.3 Hz, ενώ οι κορυφές των πρωτονίων των θέσεων 2, 3 και 4, οι οποίες είναι επίσης αποθωρακισμένες, βρίσκονται στα 5.59, 5.88, και 5.51 ppm αντίστοιχα. Σε υψηλότερα πεδία συντονισμού εντοπίζονται οι κορυφές των πρωτονίων των θέσεων 5 και 6 της γλυκόζης.

Η ουσία αυτή απομονώνεται πρώτη φορά από την οικογένεια *Raeoniaceae* αν και το ανάλογο αυτής, ο 1,2,3,6-τετρα-*O*-γαλλοϋλο-β-D-γλυκοκυρανοσίδης, έχει προηγουμένως ανιχνευθεί στη ρίζα του είδους *Paeonia suffruticosa*, επιδεικνύοντας δράση αντιπηκτική, βελτιωτική της κυκλοφορίας του αίματος, ανακουφιστική ενάντια της στάσης του αίματος⁵⁷⁹ και ικανότητα αναστολής της τυροσινάσης⁵⁸⁰. Επίσης έχει εντοπισθεί στα άνθη της *P. lactiflora* και στα φύλλα και άνθη της *P. rockii*⁴³⁴. Ακόμη έχει ανιχνευθεί σε είδη όπως *Arctostaphylos* spp. (*Ericaceae*)⁵⁸¹, στο ξύλο *Eucalyptus* spp. (*Myrtaceae*)⁵⁸², *Geranium robertianum* (*Geraniaceae*)⁵⁸³, *Juglans regia* (*Juglandaceae*)⁵⁸⁴, στα φύλλα του *Mangifera indica* (*Anacardiaceae*)^{585 586} με πιθανή αντικαρκινική δράση ακόμη και σε επιθετική μορφή καρκίνου του στήθους⁵⁸⁷, *Melaleuca styphelioides* (*Myrtaceae*) εμφανίζοντας αντιοξειδωτική και ηπατοπροστατευτική δράση σε *in vitro* δοκιμασία με HepG2 κύτταρα⁵⁸⁸, *Myrtus* spp. (*Myrtaceae*)^{589 590} και *Rosa canina* (*Rosaceae*)⁵⁹¹. Ο ίδιος δευτερογενής μεταβολίτης απομονώθηκε από τους καρπούς του *Cornus officinalis* (*Cornaceae*) και επέδειξε ισχυρή αναστολή του προδρόμου β-αμυλοειδούς ενζύμου διάσπασης πρωτεϊνών (BACE1) και μέτρια έως χαμηλή αναστολή χολινεστερασών⁵⁹². Τέλος ο 1,2,4,6-τετρα-*O*-γαλλοϋλο-β-D-γλυκοκυρανοσίδης, που έχει απομονωθεί από το είδος *Phyllanthus emblica* (*Phyllanthaceae*), εμφάνισε πιθανή ευεργετική δράση κατά του ιού της ηπατίτιδας (HBV)⁵⁹³.

Ο μεταβολίτης **P23** ταυτοποιήθηκε ως η παιωνιφλορίνη (paeoniflorin) (MW=480.466 g/mol). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας (^1H , HMBC, HSQC-DEPT) συγκρίθηκαν και επιβεβαιώθηκαν από τη βιβλιογραφία^{594 595}.



Πίνακας 106. Φασματοσκοπικά δεδομένα της παιωνιφλορίνης ((CD₃)₂SO, 600 MHz)

Θέση	¹ H-NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]	¹³ C (ppm)
1	-	87.53
2	-	84.60
3	(a) 2.04 (1H, d, J = 12.5 Hz) (b) 1.64 (1H, d, J = 12.5/1.8 Hz)	43.40
4	-	104.69
5	2.44 (1H, dd, J = 6.7/1.8 Hz)	42.07
6	(a) 2.37 (1H, dd, J = 11.0/6.7 Hz) (b) 1.81 (1H, d, J = 11.0 Hz)	21.41
7	-	69.73
8	(a) 4.61 (1H, d, J = 12.0 Hz) (b) 4.63 (1H, d, J = 12.0 Hz)	60.04
9	5.32 (1H, s)	99.75
10	1.24 (3H, s)	18.85
1'	4.38 (1H, d, J = 7.5 Hz)	98.32
2'	2.98 (1H, m)*	73.48
3'	3.10 (1H, m)*	76.85
4'	3.00 (1H, m)*	69.83
5'	3.06 (1H, m)*	76.56
6'	(a) 3.64 (1H, d, J = 12.0 Hz) (b) 3.37 (1H, dd, J = 12.0/5.6 Hz)	61.13
1''	-	129.10
2''/6''	7.99 (2H, dd, J = 7.8/1.3 Hz)	129.30
3''/5''	7.55 (2H, t, J = 7.8 Hz)	128.96
4''	7.68 (1H, tt, J = 7.8/1.3 Hz)	133.56
7''	-	165.98

*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη σημάτων

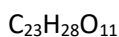
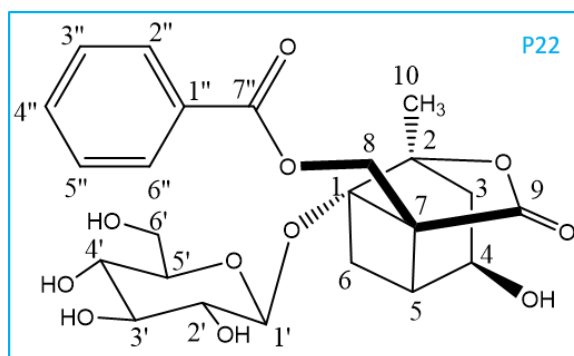
Η παιωνιφλορίνη αποτελεί το γλυκοζυλιωμένο παράγωγο της παιωνιφλοριγενόνης, ενός μονοτερπενίου πινανίου το οποίο περιγράφηκε παραπάνω (Μεταβολίτης P1). Οι ομοιότητες

μεταξύ των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ των δύο ουσιών εντοπίζονται στην αρωματική περιοχή και συγκεκριμένα αφορούν τις τρεις κορυφές μονοϋποκατεστημένου αρωματικού πυρήνα (7.99 , 7.68, 7.55 ppm), το πρωτόνιο της θέσεως 9 το οποίο εμφανίζεται ως απλή κορυφή στα 5.32 ppm λόγω γειτνίασης με τα 2 άτομα οξυγόνου και τα πρωτόνια του μεθυλίου της θέσεως 10 στα 1.24 ppm ως απλή κορυφή. Οι βασικές διαφορές των φασμάτων των δύο ουσιών αναλύονται παρακάτω. Απουσιάζει η κορυφή του πρωτονίου της θέσεως 7 λόγω δημιουργίας απλού δεσμού με τον άνθρακα 1. Τα πρωτόνια της θέσης 8, λόγω απουσίας του προαναφερθέντος γειτονικού πρωτονίου, εμφανίζονται στα 4.61-4.63 ppm ως διπλές κορυφές με $J = 12.0$ Hz. Η παρουσία β-γλυκόσης συμπεραίνεται από την εμφάνιση σήματος στα 4.38 ppm ως διπλή κορυφή με $J = 7.5$ Hz, που αντιστοιχεί στο ανωμερικό πρωτόνιο του σακχάρου (H-1'). Στη σακχαριδική περιοχή του φάσματος παρατηρούνται κορυφές που αντιστοιχούν στα υπόλοιπα πρωτόνια της γλυκόσης (2.98-3.10 ppm). Στα 2.44 ppm εμφανίζεται το ένα πρωτόνιο της θέσεως 5 ως διπλή διπλών κορυφή με $J = 6.7/1.6$ Hz.

Η παιωνιφλορίνη, όπως έχει αναφερθεί, αποτελεί χημιοταξινομικό δείκτη του γένους, έχει προηγουμένως παραληφθεί τόσο από το μεθανολικό όσο και από το υδατικό εκχύλισμα των ριζών του είδους *P. parnassica*³⁸⁸, καθώς επίσης και σχεδόν από όλα τα είδη του γένους όπως ρίζες, άνθη και σπέρματα της *P. suffruticosa*, ρίζες και άνθη της *P. lactiflora*, ρίζες της *P. anomala* και από την *P. veitchii*³⁷⁸. Έχει ανιχνευθεί στην υδρόβια φτέρη *Salvinia molesta* (Salviniaceae) και επέδειξε ικανοποιητική αντιοξειδωτική δράση σε δοκιμασία με ελεύθερη ρίζα DPPH⁵⁹⁶, αλλά και στα ριζώματα του είδους *Cimicifuga dahurica* (Ranunculaceae)⁵⁹⁷. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η ουσία φέρει κυτταροπροστατευτικές, αντιμεταλλαξιόνες, αναλγητικές, αντιαλλεργικές, αντιπυρετικές, αντιελκωτικές, αντισπασμωδικές, ηρεμιστικές, υπνωτικές, αντιυπερτασικές δράσεις, προκαλεί αγγειοδιαστολή στις στεφανιαίες αρτηρίες και δρά ευεργετικά στη χρόνια στεφανιαία νόσο και στο οξύ ισχαιμικό επεισόδιο του μυοκαρδίου, αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, αναστέλλει τη δράση της λιποξυγενάσης (LOX) και παρουσιάζει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες μέσω ποικίλων μηχανισμών⁵⁹⁸. Σε *in vivo* πείραματα έχει δειχθεί ότι η παιωνιφλορίνη μπορεί να εμφανίσει υπογλυκαιμική δράση με μείωση των επιπέδων του σακχάρου στο αίμα σε μικρές δόσεις και εντός σύντομου χρονικού διαστήματος από τη χορήγηση (25min). Δρά έναντι της οστεοπόρωσης και επάγει τη διαφοροποίηση των MC3T3-E1 οστεοβλαστών. Η παιωνιφλορίνη παρουσιάζει νευροπροστατευτική δράση⁵⁹⁹, βελτιώνει και ενισχύει τη μνήμη, όπως έχει αποδειχθεί ήδη από το 1993 σε μελέτες όπου περιόρισε την απώλεια χωρικής μνήμης, όπου προκαλείται από σκοπολαμίνη σε δοκιμασία ακτινωτού

λαβυρίνου επίμω. Τέλος, υπάρχει η άποψη ότι τα γλυκοζυλιωμένα μονοτερπένια που αποτελούν παράγωγα παιωνιφλορίνης, όπως π.χ. η οξυπαιωνιφλορίνη, είναι πιο δραστικά σε μελέτες όπως η προαναφερθείσα ή ως αντιαλλεργικοί παράγοντες σε σχέση με τα γλυκοζυλιωμένα παράγωγα αλμπιφλορίνης, με πιθανή εξήγηση την αναγκαία ύπαρξη ελεύθερης υδροξυλομάδας στη θέση 4, η οποία όταν μεθυλιώνεται οδηγεί σε απώλεια της δράσης των ουσιών⁶⁰⁰.

Ο μεταβολίτης P22 ταυτοποιήθηκε ως η αλμπιφλορίνη (albiflorin) (MW=480.466 g/mol). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας (¹H-NMR και HMBC) συγκρίθηκαν και επιβεβαιώθηκαν από τη βιβλιογραφία⁶⁰⁰.



Θέση	¹ H-NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]	¹³ C (ppm)
1	-	85.84
2	-	91.72
3	(a) 2.02 (1H, d, J = 15.6 Hz) (b) 2.40 (1H, dd, J = 15.6/6.8 Hz)	39.90
4	4.26 (1H, dd, J = 7.6/6.8 Hz)	67.06
5	2.91 (1H, t, J = 7.6 Hz)	nd
6	(a) 2.04 (1H, d, J = 11.2 Hz) (b) 2.79 (1H, dd, J = 11.2/7.6 Hz)	26.71
7	-	55.19
8	(a) 4.79 (1H, d, J = 12.2 Hz) (b) 4.66 (1H, d, J = 12.2 Hz)	60.16
9	-	177.05
10	1.51 (3H, s)	nd
1'	4.53 (1H, d, J = 7.4 Hz)	98.70
2'	3.21 (1H, m)*	nd
3'	3.23 (1H, m)*	76.65
4'	3.20 (1H, m)*	70.16
5'	3.32 (1H, m)*	76.65
6'	(a) 3.84 (1H, d, J = 11.0 Hz) (b) 3.62 (1H, dd, J = 11.0/5.8 Hz)	nd

1''	-	129.05
2''/6''	8.07 (2H, dd, $J = 7.6/1.2$ Hz)	nd
3''/5''	7.49 (2H, t, $J = 7.6$ Hz)	nd
4''	7.61 (1H, t, $J = 7.6$ Hz)	132.85
7''	-	166.54

*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη σημάτων

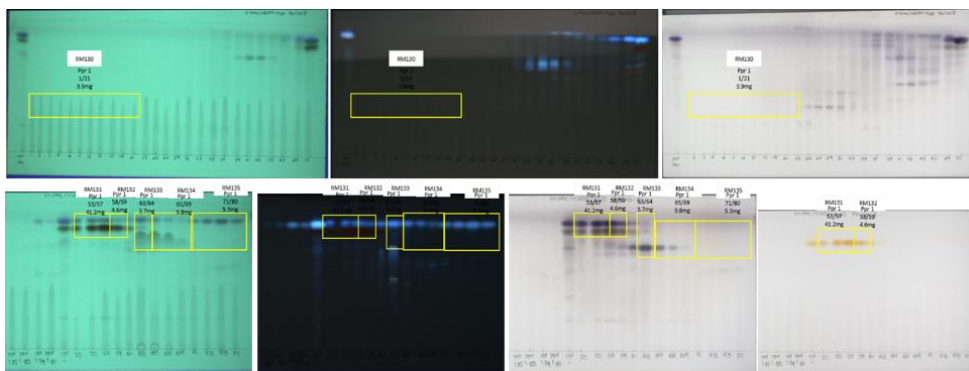
nd: not determined, δεν προσδιορίζεται από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν

Το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ μοιάζει πολύ με αυτό της παιωνιφλορίνης με βασικές διαφορές την απουσία πρωτονίου στη θέση 9 λόγω σχηματισμού καρβονυλίου (σήμα ^{13}C στα 177.05 ppm) και την εμφάνιση μιας διπλής διπλών κορυφής στα 4.26 ppm με $J = 7.6/6.8$ Hz η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσεως 4 (σήμα ^{13}C στα 67.06 ppm) το οποίο προηγουμένως ήταν υποκατεστημένο.

Έχει παραληφθεί ξανά από το μεθανολικό και υδατικό εκχύλισμα των ριζών του είδους *P. parnassica*³⁸⁸, αλλά και από τις ρίζες των ειδών *P. Suffruticosa* και *P. delavayi*, τις ρίζες και τα υπέργεια τμήματα του είδους *P. lactiflora*³⁷⁸. Έχει δειχθεί ότι η αλμπιφλορίνη εμφανίζει οστεοπροστατευτική δράση, όπως αναφέρθηκε και στην περίπτωση της παιωνιφλορίνης. Η ουσία παρουσιάζει αντικαταθλιπτική δράση, ιδιότητα γνωστή εδώ και πολλά χρόνια στην παραδοσιακή Κινεζική θεραπευτική, η οποία προκαλείται μέσω αύξησης των εξωκυτταρικών επιπέδων σεροτονίνης (5-HT) και νορεπινεφρίνης (NE) καθώς αναστέλλεται η επαναπρόσληψη τους με αξιοσημείωτα υψηλή εκλεκτικότητα⁶⁰¹. Επίσης σε βιολογική αξιολόγηση που πραγματοποιήθηκε σε 35 ουσίες που προέρχονται από την Κινεζική φυτοθεραπευτική, η αλμπιφλορίνη ήταν ανάμεσα στους τέσσερις ισχυρότερους αναστολείς της συσσώρευσης πλακών β αμυλοειδούς πρωτεΐνης και μάλιστα παρουσίασε νευροπροστατευτική δράση μέσω εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών και διατήρησης των επιπέδων του ενδοκυτταρικού ασβεστίου⁶⁰². Δεν παρουσιάζει αντιαλλεργική δράση σε αντίθεση με τα παράγωγα παιωνιφλορίνης⁶⁰⁰. Τέλος, φέρει αντισπασμωδικές ιδιότητες³⁷⁸.

Επιπροσθέτως από τα κλάσματα του CPC, μετά από επεξεργασία με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, απομονώθηκαν οι εξής μεταβολίτες:

Ppr FR.1: 103.5 mg του κλάσματος υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με στατική φάση sephadex LH-20 και κινητή φάση EtOAc:MeOH 50:50.



Εικόνα 206. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας των κλασμάτων της serphadex στο κλάσμα Ppr FR.1. Σύστημα ανάπτυξης EtOAc/MeOH/H₂O 70/10/7

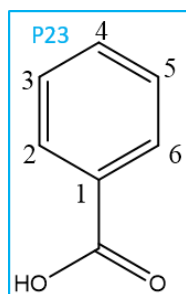
Συνολικά παρελήφθησαν 106 κλάσματα, όγκου 500 μL το καθένα, από τα οποία έξι συνενωμένα κλάσματα ελέγχθησαν για το χημικό τους φορτίο με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

Κωδικός κλάσματος	Κωδικός NMR	Βάρος δείγματος (mg)
Ppr 1 1/21	RM130	3.9
Ppr 1 53/57	RM131	41.2
Ppr 1 58/59	RM132	4.6
Ppr 1 63/64	RM133	3.7
Ppr 1 65/69	RM134	9.8
Ppr 1 71/80	RM135	5.3

Στα κλάσματα RM131 και RM132 παραλήφθηκε η παιωνιφλοριγενόνη (Μεταβολίτης P1).

Στα κλάσματα RM133 και RM134 παραλήφθηκε το βενζοϊκό οξύ (Μεταβολίτης P23).

Ο μεταβολίτης P23 ταυτοποιήθηκε ως το βενζοϊκό οξύ (benzoic acid, carboxybenzene, dracylic acid, phenylmethanoic acid) (MW= 122.123 g/mol). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας (¹H-NMR) συγκρίθηκαν και επιβεβαιώθηκαν με δεδομένα της βιβλιογραφίας⁶⁰³.





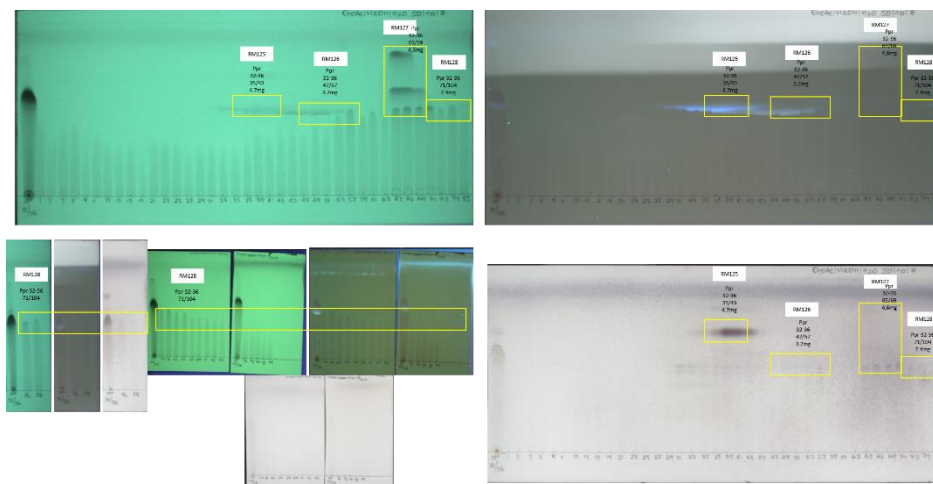
Πίνακας 107. Φασματοσκοπικά δεδομένα του βενζοϊκού οξέος (MeOD, 400 MHz)

Θέση	$^1\text{H-NMR}$ [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]
2/6	8.01 (2H, dd, $J = 7.8/1.2$ Hz)
3/5	7.46 (2H, t, $J = 7.8$ Hz)
4	7.58 (1H, tt, $J = 7.8/1.2$ Hz)

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ εντοπίζονται οι 3 κορυφές των 5 πρωτονίων μονοϋποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου ως εξής: στα 8.01 ppm διπλή διπλών κορυφή με $J = 7.8/1.2$ Hz που ολοκληρώνει για 2 πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πιο αποθωρακισμένα πρωτόνια των θέσεων 2 και 6, στα 7.58 ppm τριπλή τριπλών κορυφή με $J = 7.8/1.2$ Hz που ολοκληρώνει για 1 πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 4 και στα 7.46 ppm τριπλή κορυφή με $J = 7.8$ Hz που ολοκληρώνει για 2 πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια των θέσεων 3 και 5.

Το βενζοϊκό οξύ δεν έχει απομονωθεί ξανά από την ρίζα της *P. parnassica*, αλλά από τις ρίζες των ειδών *P. clusii* ssp. *clusii*, *P. mascula* ssp. *hellenica*, *P. anomala*, *P. anomala* ssp. *veitchii*, *P. suffruticosa*, *P. lactiflora*, *P. broteroi*, *P. emodi* και από τα άνθη της *P. decora*³⁷⁸. Γενικότερα, αποτελεί κοινό μεταβολίτη που απαντάται σε διάφορα φυτικά είδη. Παρουσιάζει δράση κατά των ακάρεων (acaricides, *Tyrophagus putrescentiae*). Προστίθεται στα τρόφιμα και στα φαρμακευτικά προϊόντα ως ασφαλές συντηρητικό, κατόπιν έγκρισης από τον FDA, καθώς είναι αποτελεσματικός αντιμυκητιασικός παράγοντας, ο οποίος σε όξινο περιβάλλον διαπερνά το κυτταρικό τοίχωμα των μυκήτων προκαλώντας εσωτερική οξίνιση του κυττάρου. Αυτό έχει ως συνέπεια τη μείωση της γλυκόλυσης και την εξάντληση της τριφωσφορικής αδενοσίνης, τα οποία οδηγούν σε αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων των μυκήτων. Ευρέως γνωστή είναι η ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, τόσο του βενζοϊκού οξέος όσο και ιδιαίτερα των παραγώγων του που φέρουν ελεύθερες υδροξυλομάδες ικανές να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες⁴⁰⁸. Επίσης, είναι βακτηριοστατικό, αντιφλεγμονώδες και κυτταροτοξικό, αναστέλλει τη τυροσινάση και παρουσιάζει αντιδιαβητική δράση. Επίσης, παράγωγά του έχουν αναφερθεί ως αντιχολινεστερασικοί παράγοντες για την ανάπτυξη φαρμάκων κατά του Alzheimer.

[Ppr FR.28-31](#): 137.5 mg του κλάσματος υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με στατική φάση sephadex LH-20 και κινητή φάση MeOH.



Εικόνα 207. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας των κλασμάτων της *serphadex* στα κλάσματα *Ppr* FR.28-31. Σύστημα ανάπτυξης EtOAc/MeOH/H₂O 50/10/7

Συνολικά παρελήφθησαν 104 κλάσματα, όγκου 500 μL το καθένα, από τα οποία 4 συνενωμένα κλάσματα ελέγχθησαν με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

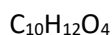
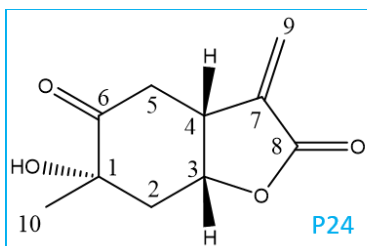
Κωδικός κλάσματος	Κωδικός NMR	Βάρος δείγματος (mg)
Ppr 32-36 35/43	RM125	4.7
Ppr 32-36 47/57	RM126	3.2
Ppr 32-36 65/69	RM127	4.6
Ppr 32-36 71/104	RM128	7.4

Στο κλάσμα RM125 παραλήφθηκε η παιωνιλακτόνη Β (paeonilactone Β). (Μεταβολίτης [P24](#))

Το κλάσμα RM126 (και RM128) ταυτοποιήθηκε ως η 1,2,3,4,6-πεντα-Ο-γαλλοϋλο-β-D-γλυκοπυρανόση (PGG).

Στο κλάσμα RM127 ανιχνεύονται ο γαλλικός μεθυλεστέρας, το γαλλικό οξύ και η 1,2,3,4,6-πεντα-Ο-γαλλοϋλο-β-D-γλυκοπυρανόση (PGG).

Ο μεταβολίτης [P24](#) ταυτοποιήθηκε ως η παιωνιλακτόνη Β (paeonilactone Β) (MW=196.202 g/mol). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας (¹H, COSY, HSQC-DEPT και HMBC) συγκρίθηκαν και επιβεβαιώθηκαν με δεδομένα της βιβλιογραφίας⁶⁰⁴.



Πίνακας 108. Φασματοσκοπικά δεδομένα της παιωνιλακτόνης Β (MeOD, 600 MHz)

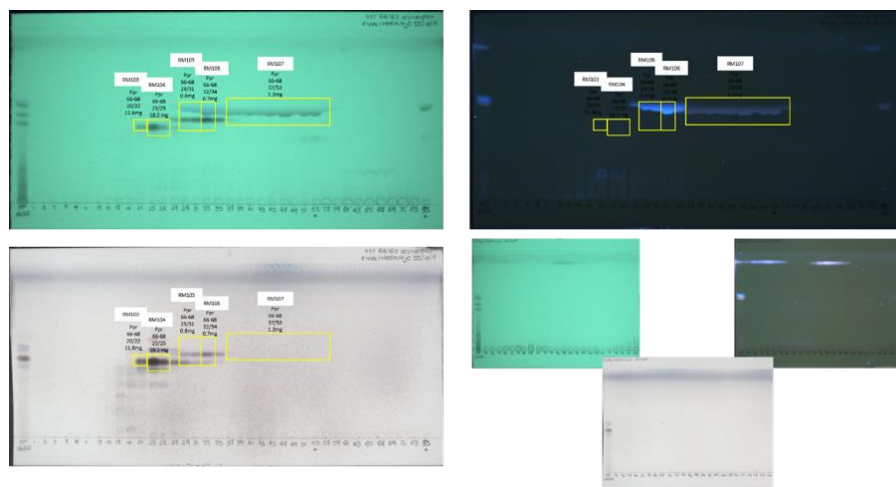
Θέση	$^1\text{H-NMR}$ [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]	^{13}C (ppm)
1	-	71.95
2	(a) 2.32 (1H, dd, $J = 14.3/5.6$ Hz) (b) 2.12 (1H, dd, $J = 14.3/7.0$ Hz)	41.58
3	5.04 (1H, m)	76.61
4	3.70 (1H, m)	39.22
5	(a) 2.91 (1H, dd, $J = 16.1/7.1$ Hz) (b) 2.72 (1H, dd, $J = 16.1/4.7$ Hz)	39.70
6	-	210.15
7	-	139.08
8	-	170.57
9	(a) 6.19 (1H, d, $J = 3.0$ Hz) (b) 5.70 (1H, d, $J = 3.0$ Hz)	122.70
10	1.30 (3H, s)	24.97

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ και συγκεκριμένα στην περιοχή των διπλών δεσμών παρατηρούμε δύο διπλές κορυφές με $J = 3.0$ Hz στα 6.19 και 5.70 ppm, οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια του εξωμεθυλενίου (H-9). Το σήμα του ^{13}C της θέσης 9 εμφανίζεται στα 122.70 ppm. Το H-3 εμφανίζεται ως μια πολλαπλή κορυφή στα 5.04 ppm, αρκετά πιο αποθωρακισμένο λόγω της γειτνίασης του με το οξυγόνο, σε σχέση το H-4 το οποίο εντοπίζεται στα 3.70 ppm ως μια πολλαπλή κορυφή. Αντίστοιχη αποθωράκιση παρατηρείται και στα σήματα άνθρακα. Στα 2.91 ppm και 2.72 ppm ως διπλές διπλών κορυφές εμφανίζονται τα πρωτόνια της θέσεως 5, ενώ στα 2.32 ppm και 2.12 ppm με την ίδια πολλαπλότητα εντοπίζονται τα πρωτόνια της θέσεως 2. Τα πρωτόνια του μεθυλίου της θέσης 10 παρατηρούνται στα 1.30 ppm ως μια απλή κορυφή που ολοκληρώνει για 3 πρωτόνια.

Η παιωνιλακτόνη Β απομονώνεται πρώτη φορά από το είδος *P. parnassica* και συγκεκριμένα από το υδατομεθανολικό εκχύλισμα των ριζών του. Τόσο ο συγκεκριμένος

μεταβολίτης, όσο και τα παράγωγά του (παιωνιλακτόνες A-C), απαντώνται σε μικρή περιεκτικότητα στα εκχυλίσματα του γένους, ενώ έχουν απομονωθεί ξανά από το μεθανολικό εκχύλισμα ριζών του είδους *P. lactiflora* (*P. albiflora*). Δεν υπάρχουν πολλές αναφορές για τη βιολογική δράση του μεταβολίτη και ειδικά τις επιδράσεις του στα ένζυμα της Hyal και AChE. Όσον αφορά το Κ.Ν.Σ., η παιωνιλακτόνη C, σε σχέση με την παιωνιλακτόνη Β, έχει επιδείξει υψηλότερη νευροπροστατευτική δράση της πρωτογενούς καλλιέργειας κυττάρων (νευρώνες και γλοία) του εγκεφάλου επίμυων έναντι της κυτταροτοξικότητας που επάγεται από το υπεροξειδίο του υδρογόνου, πιθανόν λόγω της ύπαρξης του βενζοϋλο-υποκαταστάτη στο σκελετό της πρώτης⁴²⁷.

Ppr FR.58-60: 76 mg του κλάσματος υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με στατική φάση serphadex LH-20 και κινητή φάση MeOH:H₂O 85:15.



Εικόνα 208. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας των κλασμάτων της serphadex στα κλάσματα Ppr FR.58-60. Σύστημα ανάπτυξης EtOAc/MeOH/H₂O 55/10/7

Συνολικά παρελήφθησαν 120 κλάσματα, όγκου 500 μL το καθένα, από τα οποία πέντε συνενωμένα κλάσματα ελέγχθησαν με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

Κωδικός κλάσματος	Κωδικός NMR	Βάρος δείγματος (mg)
Ppr 66-68 20/22	RM103	11.6
Ppr 66-68 23/25	RM104	18.2
Ppr 66-68 29/31	RM105	0.8
Ppr 66-68 32/34	RM106	0.7
Ppr 66-68 37/53	RM107	1.2

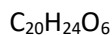
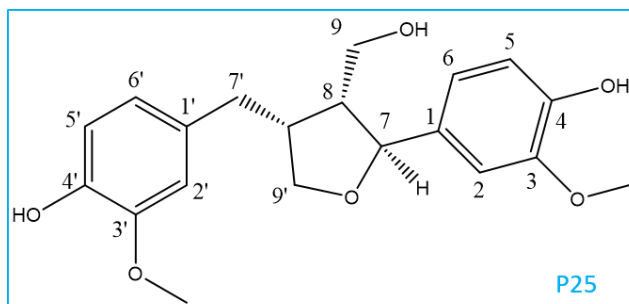
Στο κλάσμα RM104 παραλήφθηκε η αλμπιφλορίνη (albiflorin) (σχετικά καθαρή και στο κλάσμα RM103) (Μεταβολίτης P22).

Στο κλάσμα RM105 παραλήφθηκε η λαρισρεσινόλη (lariciresinol) (Μεταβολίτης P25).

Στο κλάσμα RM106 παραλήφθηκε η οξυπαιωνιφλορίνη (oxyraeoniflorin) (Μεταβολίτης P26).

Στο κλάσμα RM107 παραλήφθηκε το 3,3'-διμεθοξυ-4-σουλφοξυελλαγικό οξύ, ο ίδιος μεταβολίτης με το RM115 (Μεταβολίτης P28) που περιγράφεται παρακάτω.

Ο μεταβολίτης P25 ταυτοποιήθηκε ως η λαρισρεσινόλη (lariciresinol) (MW=360.40 g/mol). Ανήκει στην κατηγορία των λιγνανίων. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας (^1H , COSY, HSQC-DEPT και HMBC) συγκρίθηκαν και επιβεβαιώθηκαν με δεδομένα της βιβλιογραφίας⁶⁰⁵.



Θέση	$^1\text{H-NMR}$ [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]	^{13}C (ppm)
1	-	135.8
2	6.90 (1H, d, $J = 1.8$ Hz)	119.75
3	-	149.0
4	-	147.47
5	6.81 (1H, m)*	113.81
6	6.80 (1H, m)*	116.32
7	4.90 (1H, d, $J = 7.0$ Hz)	103.01
8	2.38 (1H, m)	54.30
9	(a) 3.63 (1H, dd, $J = 10.9/6.5$ Hz) (b) 3.83 (1H, dd, $J = 10.9/8.0$ Hz)	62.60
1'	-	138.03
2'	7.01 (1H, d, $J = 1.9$ Hz)	111.72

3'	-		149.0
4'	-		144.76
5'	6.73 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)		116.57
6'	6.66 (1H, dd, $J = 8.0/1.9$ Hz)		122.38
7'	(a) 2.50 (1H, dd, $J = 13.4/11.1$ Hz)	(b) 2.92 (1H, dd, $J = 13.4/4.8$ Hz)	33.47
8'	2.73 (1H, m)		43.59
9'	(a) 3.72 (1H, dd, $J = 8.4/5.8$ Hz)	(b) 3.92 (1H, dd, $J = 8.4/6.5$ Hz)	73.66
CH ₃ O-	3.85 (3H, s) 3.87(3H, s)		56.76

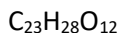
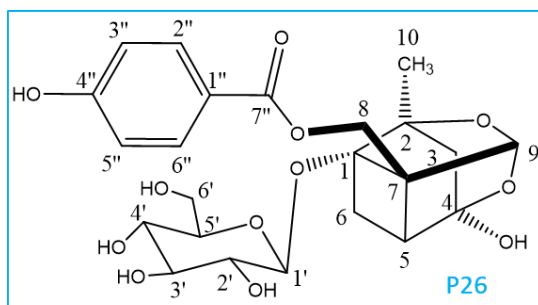
*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη σημάτων

Στα φάσματα NMR παρατηρούνται τα εξής: α) 2 ABX συστήματα στα δ 6.90, 6.81, 6.80 και δ 7.01, 6.73, 6.66, β) στην οξυγονωμένη περιοχή (δ 4.90) του φάσματος υπάρχει η κορυφή της θέσης 7, με άνθρακα στα 103.01 ppm, γ) στην οξυγονωμένη αλλά και στην αλειφατική περιοχή υπάρχουν 6 διπλές διπλών κορυφές που αντιστοιχούν στα 6 πρωτόνια των 3 μεθυλενικών ανθράκων των θέσεων 9 (3.63 και 3.83 ppm, 62.60 ppm), 7' (2.50 και 2.92 ppm, 33.47 ppm) και 9' (3.92 και 3.72 ppm, 73.66 ppm), δ) στα δ 3.85 και 3.87 υπάρχουν οι δύο απλές κορυφές των μεθοξυλίων του μορίου και ε) στα δ 2.73 και 2.38 υπάρχουν οι κορυφές των πρωτονίων των θέσεων 8' και 8.

Η ουσία απομονώνεται πρώτη φορά από το γένος *Paeonia*. Στην παιώνια είναι λίγα τα λιγνάνια που έχουν βρεθεί. Οκτώ λιγνάνια απομονώθηκαν για πρώτη φορά το 2015 από το αλκοολικό εκχύλισμα των ριζών του είδους *Paeonia lactiflora*⁶⁰⁶. Ανάμεσα σε αυτά ήταν δύο ζευγάρια νέων εναντιομερών 8-O-4' νεολιγνανίων, δύο νέα νεολιγνάνια βενζοφουρανίου και δύο γνωστοί γλυκοσίδες νεολιγνανίων. Γενικότερα ο μεταβολίτης έχει παραληφθεί από διάφορα φυτικά είδη, όπως είναι τα υπέργεια τμήματα των ειδών *Justicia glauca* Rottl (Acanthaceae), *Daphne oleoides* (Thymelaeaceae), *Sambucus nigra* (Adoxaceae), ο φλοιός βλαστού του *Picea jezoensis* var. *jezoensis* (Pinaceae), τα φύλλα και οι βλαστοί του *Cestrum aurantiacum* (Solanaceae), οι ρίζες του *Syringa pinnatifolia* (Oleaceae), το μεθανολικό εκχύλισμα κλαδιών του *Spiraea prunifolia* var. *simpliciflora* (Rosaceae), τα κλαδιά του *Salix glandulosa* (Salicaceae) κτλ. Η λαρισιρεσινόλη, μέσα από *in vitro* δοκιμασίες, έχει επιδείξει τις παρακάτω δράσεις: αντιοξειδωτική⁶⁰⁷, βρογχοδιασταλτική, αντιφλεγμονώδη, αντινεοπλασματική (HepG2⁶⁰⁸, οιστρογονική (estrogen receptor), SK-MEL-2, MCF-7, B164A5 melanoma cells), φυτοτοξική, αντιβιοτική, νευροπροστατευτική. Επίσης σε δοκιμασία αναστολής της AChE δεν εμφάνισε

σημαντικά αποτελέσματα⁶⁰⁹. Τα λιγνάνια που απομονώθηκαν από τη *Raemonia lactiflora* εμφάνισαν ικανότητα αναστολής της συσσώρευσης των πλακών του β-αμυλοειδούς.

Ο μεταβολίτης **P26** ταυτοποιήθηκε ως η οξυπαιωνιφλορίνη (oxyraeoniflorin) (MW=496.465 g/mol). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας (¹H, COSY, HSQC-DEPT και HMBC) συγκρίθηκαν και επιβεβαιώθηκαν με δεδομένα της βιβλιογραφίας⁶¹⁰.



Πίνακας 109. Φασματοσκοπικά δεδομένα της οξυπαιωνιφλορίνης (MeOD, 600 MHz)

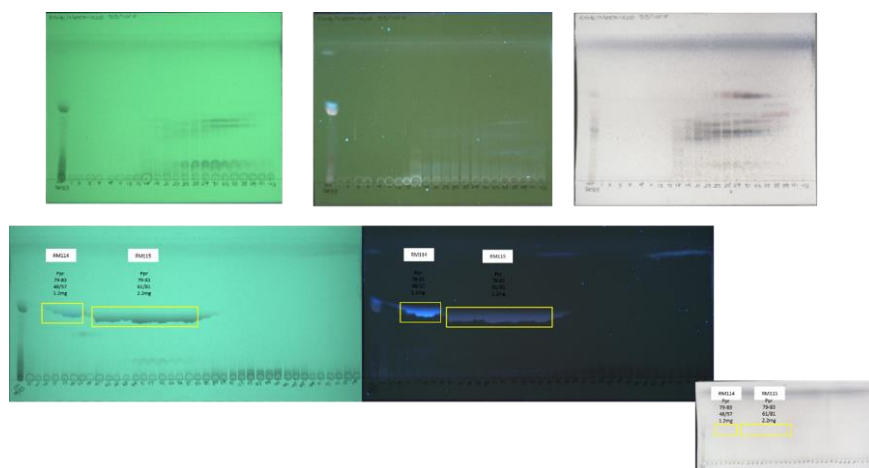
Θέση	¹ H-NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]	¹³ C (ppm)
1	-	87.67
2	-	85.97
3	(a) 2.18 (1H, d, J = 12.4 Hz) (b) 1.79 (1H, d, J = 12.4 Hz)	43.07
4	-	105.20
5	2.56 (1H, dd, J = 6.9/1.2 Hz)	42.32
6	(a) 2.47 (1H, dd, J = 11.6/6.9 Hz) (b) 1.94 (1H, d, J = 11.6 Hz)	22.03
7	-	70.90
8	(a) 4.71 (1H, d, J = 12.0 Hz) (b) 4.69 (1H, d, J = 12.0 Hz)	59.58
9	5.39 (1H, s)	100.96
10	1.34 (3H, s)	17.94
1'	4.52 (1H, d, J = 7.7 Hz)	98.76
2'-5'	3.19-3.24 (4H, m)	(2') 73.69 (3') 76.60 (4') 70.57 (5') 76.60
6'	(a) 3.84 (1H, d, J = 11.5 Hz) (b) 3.60 (1H, dd, J = 11.5/4.6 Hz)	61.36
1''	-	120.94
2''/6''	7.91 (2H, d, J = 8.7 Hz)	131.66
3''/5''	6.83 (2H, d, J = 8.7 Hz)	114.76

4''	-	162.30
7''	-	166.80

Η οξυπαιωνιφλορίνη είναι ένα ομόλογο της παιωνιφλορίνης, το οποίο φέρει ένα παραυδροξυβενζοϋλο σύστημα αντί μίας βενζοϋλο ομάδας. Για το λόγο αυτό το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ είναι παρόμοιο με αυτό της παιωνιφλορίνης, με μόνη διαφοροποίηση αυτή των κορυφών στην αρωματική περιοχή, λόγω ύπαρξης του A_2B_2 συστήματος, με τα πρωτόνια των θέσεων 2'', 6'' να εμφανίζονται στα 7.91 ppm ως διπλή κορυφή με $J = 8.7$ Hz και τα πρωτόνια των θέσεων 3'', 5'' στα 6.83 ppm ομοίως ως διπλή κορυφή με $J = 8.7$ Hz, με αντίστοιχους άνθρακες στα 131.66 ppm και 114.76 ppm.

Η ουσία έχει παραληφθεί ξανά από το υδατικό εκχύλισμα των ριζών του είδους *P. parnassica*³⁸⁸, αλλά και από άλλα είδη του γένους, όπως *P. suffruticosa*, *P. albiflora*, *P. veitchii*³⁷⁸. Παρουσιάζει χαμηλή αντιοξειδωτική δράση, περιορίζει την απώλεια χρωρικής μνήμης όπως η παιωνιφλορίνη, ενώ όπως και η παιωνιφλοριγενόνη προκαλεί μείωση του NO σε μικρογλοιακές κυτταρικές σειρές N9 μύων οι οποίες είναι ενεργοποιημένες από λιποπολυσακχαρίτες⁴⁰⁸.

Ppr FR.68-72: 65 mg του κλάσματος υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με στατική φάση sephadex LH-20 και κινητή φάση MeOH:H₂O 85:15.



Εικόνα 209. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας των κλασμάτων της sephadex στα κλάσματα Ppr FR.68-72. Σύστημα ανάπτυξης EtOAc/MeOH/H₂O 55/10/7

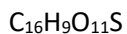
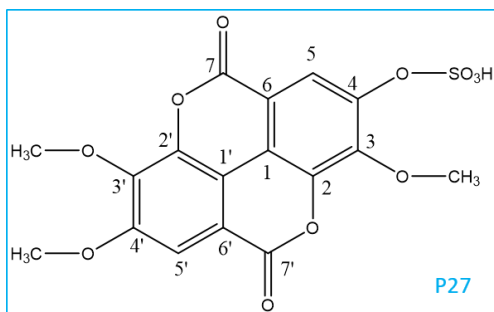
Συνολικά παρελήφθησαν 120 κλάσματα, όγκου 500 μL το καθένα, από τα οποία 2 συνενωμένα κλάσματα ελέγχθησαν για το χημικό τους φορτίο με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

Κωδικός κλάσματος	Κωδικός NMR	Βάρος δείγματος (mg)
Ppr 79-83 48/57	RM114	1.2
Ppr 79-83 61/81	RM115	2.2

Στο κλάσμα RM114 παραλήφθηκε το 3,3',4'-τριμεθοξυ-4-σουλφοξυελλαγικό οξύ (3,3',4'-trimethoxy-4-sulphoxyellagic acid) (Μεταβολίτης P27).

Στο κλάσμα RM115 παραλήφθηκε το 3,3'-διμεθοξυ-4-σουλφοξυελλαγικό οξύ (3,3'-dimethoxy-4-sulphoxyellagic acid) (Μεταβολίτης P28).

Ο μεταβολίτης P27 ταυτοποιήθηκε ως το 3,3',4'-τρι-Ο-μεθυλο-4-σουλφοξυελλαγικό οξύ (MW=408.9877 g/mol). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας (^1H , COSY, HSQC-DEPT και HMBC) συγκρίθηκαν και επιβεβαιώθηκαν με δεδομένα της βιβλιογραφίας⁶¹¹.



Πίνακας 110. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 3,3',4'-τρι-Ο-μεθυλο-4-σουλφοξυελλαγικού οξέος (MeOD, 600 MHz)

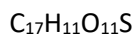
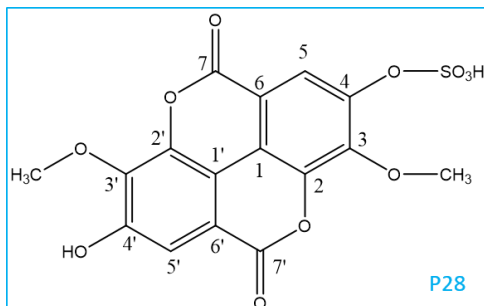
Θέση	$^1\text{H-NMR}$ [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]	^{13}C
1	-	116.56
2	-	139.50
3	-	144.77
4	-	144.40
5	8.33 (1H, s)	120.89
6	-	110.00
7	-	158.99
1'	-	110.50
2'	-	138.34
3'	-	140.94

4'	-	152.97
5'	7.62 (1H, s)	113.17
6'	-	111.27
7'	-	159.30
MeO-3	4.28 (3H, s)	62.50
MeO-3'	4.21 (3H, s)	62.25
MeO-4'	3.92 (3H, s)	56.94

Τα φάσματα των μεταβολιτών **P27** και **P28** (αναλύεται παρακάτω) είναι ίδια με μόνη διαφορά τα 3 επιπλέον πρωτόνια της μεθοξυ-ομάδας στη θέση 4', που εμφανίζονται στα 3.92 ppm και ο αντίστοιχος άνθρακας στα 56.94 ppm. Μέσω HMBC έγινε δυνατή η εύρεση της θέσης σύνδεσης του 3^{ου} μεθυλίου.

Ο μεταβολίτης απομονώνεται πρώτη φορά από την οικογένεια Rhamnaceae και γενικώς δεν απαντάται συχνά στο φυτικό βασίλειο. Έχει απομονωθεί ξανά από τα είδη *Euphorbia sororia* (Euphorbiaceae), *Potentilla candidans* (Rosaceae) και από το ρίζωμα του *Geum rivale* (Rosaceae)⁶¹¹. Τα φαινολικά παράγωγα που φέρουν θειούχο υποκαταστάτη ασκούν αντιπηκτική, αντιαγγειογεννητική, αντιβακτηριακή και αντιφλεγμονώδη δράση. Για το συγκεκριμένο μεταβολίτη που απομονώθηκε από την *P. candidans*, έχει μονάχα αναφερθεί η ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι της ρεδοουκτάσης της αλδόζης που εμπλέκεται στη παθογένεια του διαβήτη. Μέτρια αντιμικροβιακή δράση έχουν εμφανίσει και τα δύο παράγωγα, έναντι στελεχών *Bacillus subtilis* και *Staphylococcus aureus*, ενώ δεν είναι δραστικά έναντι της *E. coli*. Όπως είναι γνωστό, το ελλαγικό οξύ αποτελεί χημειοπροστατευτικό παράγοντα, καθώς αποτρέπει την καταστροφή του DNA και τις μεταλλάξεις που επάγονται από διάφορα καρκινογόνα. Ωστόσο η μεθυλίωση των υδροξυλομάδων μειώνει την κυτταροτοξική δράση, όπως έχει αποδειχθεί από την περιορισμένη δράση των μορίων που απομονώθηκαν σε σειρές λευχαιμίας και μελανώματος. Μάλιστα τα πιο πολικά γλυκοσιδικά μεθυλιωμένα παράγωγα είναι ακόμη πιο αδρανή. Σαν συμπέρασμα πιστεύεται ότι η μεθυλίωση που συνοδεύεται από θειούχο υποκατάσταση έχει αρνητική επίδραση στην κυτταροτοξική δράση των παραγώγων ελλαγικού οξέος, πιθανότατα λόγω μη διαθεσιμότητας των υδροξυλίων να αλληλεπιδράσουν και να κάνουν δεσμούς υδρογόνου. Τέλος, αυτού του είδους η υποκατάσταση ενδεχομένως δυσχεραίνει και τη διαμεμβρανική διέοδο των μορίων.

Ο μεταβολίτης P28 ταυτοποιήθηκε ως το 3,3'-διμεθοξυ-4-σουλφοξυελλαγικό οξύ (MW=423.0022 g/mol). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας (¹H, COSY, HSQC-DEPT και HMBC) συγκρίθηκαν και επιβεβαιώθηκαν με δεδομένα της βιβλιογραφίας⁶¹¹.



Πίνακας 111. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 3,3'-διμεθοξυ-4-σουλφοξυελλαγικού οξέος (MeOD, 600 MHz)

Θέση	¹ H-NMR [δ (ολοκλήρωση, πολλαπλότητα, J (Hz))]	¹³ C (ppm)
1	-	116.56
2	-	139.50
3	-	144.77
4	-	144.40
5	8.33 (1H, s)	120.89
6	-	110.00
7	-	158.99
1'	-	110.50
2'	-	138.34
3'	-	140.94
4'	-	152.97
5'	7.62 (1H, s)	113.17
6'	-	111.27
7'	-	159.30
Me-3	4.28 (3H, s)	62.50
Me-3'	4.21 (3H, s)	62.25

Στο φάσμα ¹H-NMR της ουσίας παρατηρούνται μόνο 4 απλές κορυφές, εκ των οποίων οι

δύο είναι στην αρωματική περιοχή και συγκεκριμένα στα 8.33 και 7.62 ppm και αντιστοιχούν στα πρωτόνια των θέσεων 5, 5' και οι άλλες δύο βρίσκονται στην οξυγονωμένη περιοχή και συγκεκριμένα στα 4.28 και 4.21 ppm και αντιστοιχούν στα πρωτόνια των μεθυλίων των θέσεων 3, 3'. Στο φάσμα COSY δεν υπάρχουν σήματα συσχέτισης. Αν συγκριθούν τα σήματα της ουσίας με αυτά των μη υποκατεστημένων ελλαγικών οξέων και των μεθυλαιθέρων του, θα γίνει εμφανής η μετατόπιση του πρωτονίου της θέσης 5 σε χαμηλότερα πεδία συντονισμού, ενδεικτική του ανισοτροπικού φαινομένου του ισχυρού ηλεκτραρνητικού υποκαταστάτη σε *ortho* θέση και ειδικότερα λόγω ύπαρξης της θειούχου ομάδας στον άνθρακα 4. Στο φάσμα HSQC τα σήματα των ανθράκων των μεθοξυ-υποκαταστατών εντοπίζονται αρκετά αποθωρακισμένα, στα 62.25 και 62.50 ppm. Το σήμα του C-4 εμφανίζεται σε υψηλότερα πεδία συντονισμού συγκριτικά με το ελεύθερο ελλαγικό οξύ και έτσι επιβεβαιώνεται η θέση σύνδεσης της θειϊκής ομάδας.

Και αυτή η ουσία απομονώνεται πρώτη φορά από την οικογένεια και γενικότερα είναι σπάνια στο φυτικό βασίλειο. Έχει απομονωθεί από το ξύλο του είδους *Tamarix tetragyna* (Tamaricaceae) και από το ρίζωμα του *Geum rivale* (Rosaceae). Μόνο 8 είδη, τα οποία ανήκουν σε 5 διαφορετικές οικογένειες, έχει βρεθεί ότι περιέχουν παράγωγα ελλαγικού οξέος με θείο και πέρα από αυτά που αναφέρθηκαν τα υπόλοιπα είναι τα *Tamarix amplexicaulis*, *Frankenia laevis* (Frankeniaceae), *Lagerstroemia speciosa* (Lythraceae), *Reaumuria vermiculata* (Tamaricaceae).

14.3.9 Βιολογική αξιολόγηση καθαρών ουσιών

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες που απομονώθηκαν από τα εκχυλίσματα PPRC και PPAC αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητα αναστολής της AChE (Μέθοδοι Ellman's και NA-FBB) και της HgαI, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (μg/mL). Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 112. % Ενζυμική αναστολή (AChE Ellman's, AChE NA-FBB, Hyal) των καθαρών απομονωμένων ουσιών των εκχυλισμάτων PPAC και PPRC, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

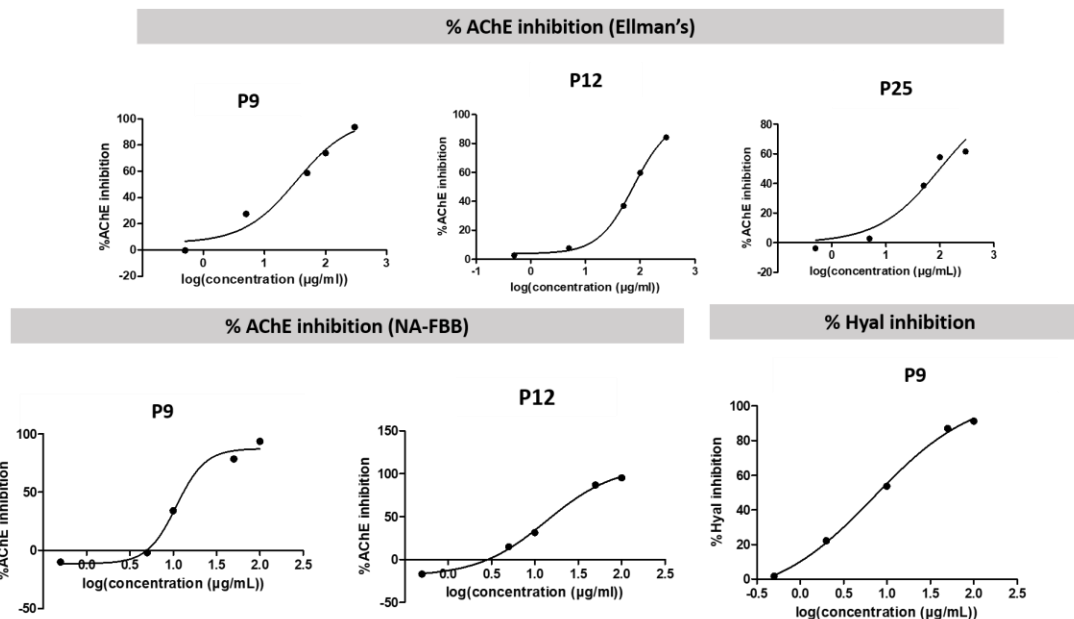
	AChE Ellman's						AChE NA-FBB	Hyal	
	300	100	75	50	5	0.5	100	75	100
P1	-	-	5.83 ±1.00	-	-	-	-	7.63 ±4.93	-
P2 P3	-	-	26.81 ±1.02	-	-	-	-	-	-0.67 ±1.12
P4	-	-	28.85 ±0.91	-	-	-	-	25.83 ±0.76	-
P5	-	-	19.99 ±2.42	-	-	-	69.44±2.71	29.45 ±1.52	-
P6	-	-	29.51 ±0.79	-	-	-	89.70±0.17	9.77 ±1.88	-
P7 P8	-	-	35.44 ±0.79	-	-	-	-	32.29 ±1.14	-
P9	IC ₅₀ =33.44 µg/mL						IC ₅₀ =10.86 µg/mL	IC ₅₀ =7.07 µg/mL	
P10	-	-	25.48 ±0.79	-	-	-	-	57.04± 1.07	-
P11	-	3.83 ±2.50	-	-	-	-	-	-	-25.22 ±1.20
P12	IC ₅₀ =75.62 µg/mL*						IC ₅₀ =13.61 µg/mL	-	15.90 ±0.06
P13 P14	-	61.82± 0.72*	-	-	-	-	-	-	31.99 ±6.11
P15	8.14±1 .61	9.46 ±0.66	-	1.82± 1.25	0.83± 0.51	7.57± 1.39	14.49±3.90	2.90-	36.13 ±4.00
P16	23.29± 5.83	-	-	-	-	-	90.72±0.20	-	30.13 ±2.50
P17 P18	33.39± 3.47	10.55 ±1.32	-	8.51 ±1.92	9.62 ±0.33	-0.90 ±0.22	-	-	55.26± 7.67
P20	-	-	33.93 ±0.32	-	-	-	-	34.93± 5.36	-
P21	23.30± 2.39	5.74 ±0.75	3.09 ±0.36	0.02 ±1.00	-2.17 ±1.89	0.46 ±2.40	6.66±2.90	9.11 ±1.67	-
P22	39.47± 0.63	27.28 ±0.97	-	16.66 ±1.19	8.10 ±0.95	5.97 ±1.14	-	11.32± 0.16	-
P23	61.62	57.75	-	38.55	2.77	-3.90	9.68±4.14	-	40.31± 2.84

P24	53.89± 0.62	40.76 ±0.90	-	35.91 ±2.13	4.09 ±2.03	0.47 ±2.31	50.55±1.65	-	29.12± 9.03
P27	-	29.68 ±0.06	-	-	-	-	-	-	4.68 ±2.30
P28	-	27.16 ±1.07	-	-	-	-	81.55±1.11	-	33.33± 3.64

*Η ουσία P12 άλλαξε χρώμα (πιθανή αλλοίωση) ή/και σημειώθηκε πολύ υψηλό blank στις μεγάλες συγκεντρώσεις (π.χ. 0.6) (pro oxidant activity, Fenton reaction, hydrogen peroxide) (επιβεβαιώθηκε η αστάθεια του στο PBS buffer 0.1M pH 8 με χρήση πρότυπου στα 300μg/mL)^{612 442}

Στη βιοδοκιμασία αναστολής της AChE (Ellman's), για τις πιο δραστικές ουσίες, 1,2,3,4,6-πεντα-Ο-γαλλοϋλο-β-D-γλυκοκυρανόση (P9), γαλλικό οξύ (P12), βενζοϊκό οξύ (P23) κατασκευάστηκαν καμπύλες συγκέντρωσης-αναστολής και υπολογίστηκαν οι τιμές IC₅₀ οι οποίες είναι: P9: 33.44 μg/mL (MW=940.67 g/mol, IC₅₀=35.55 μM), P12: 75.62 μg/mL, P23: 100.7 μg/mL (MW=122.12 g/mol, IC₅₀=824.6 μM).

Στη βιοδοκιμασία αναστολής της AChE (NA-FBB), για τις ουσίες 1,2,3,4,6-πεντα-Ο-γαλλοϋλο-β-D-γλυκοκυρανόση (P9) και γαλλικό οξύ (P12), κατασκευάστηκαν καμπύλες συγκέντρωσης-αναστολής και υπολογίστηκαν οι τιμές IC₅₀ οι οποίες είναι: P9: 10.86 μg/mL (11.54 μM) και P12: 13.61 μg/mL.



Εικόνα 210. Καμπύλες IC₅₀ των καθαρών απομονωμένων ουσιών των εκχυλισμάτων PPAC και PPRC. *P25 είναι ο μεταβολίτης P23 (βενζοϊκό οξύ)

Η παιωνιφλοριγενόνη (P1), το μείγμα των δύο διγαλλικών μεθυλεστέρων (P2, P3), ο 3-Ο-σοφοροσίδης της λιμοσιτρίνης (P11), η παιωνιφλορίνη (P21) και η αλμπιφλορίνη (P22)

εμφάνισαν χαμηλή δραστικότητα στη δοκιμασία αναστολής της AChE με τη μέθοδο Ellman's (π.χ. P11:100 $\mu\text{g/mL}$, $3.83 \pm 2.50\%$, P21:100 $\mu\text{g/mL}$, $5.74 \pm 0.75\%$) και με τη μέθοδο NA-FBB, όσες από αυτές αξιολογήθηκαν. Ο 3-*O*-νεοεσπεριδοσίδης της κερκετίνης (P16) εμφάνισε χαμηλή δραστικότητα στη δοκιμασία αναστολής της AChE με τη μέθοδο Ellman's (300 $\mu\text{g/mL}$, $23.29 \pm 5.83\%$) αλλά υψηλή δραστικότητα με τη μέθοδο NA-FBB (100 $\mu\text{g/mL}$, $90.72 \pm 0.20\%$). Αξιοσημείωτη δραστικότητα (100 $\mu\text{g/mL}$, $\sim 50\%$), και στις δύο μεθόδους, εμφάνισε η παιωνιλακτόνη Β (P24). Ο γαλλικός μεθυλεστέρας (P4), ο 3-*O*- α -αραβινοπυρανοσίδης της καιμπφερόλης (P5), ο 3-*O*- α -αραβινοπυρανοσίδης της κερκετίνης (P6), το μείγμα των δύο διγαλλικών οξέων (P7, P8), ο 3-*O*-σοφοροσίδης της 8-μεθοξυκαιμπφερόλης (P10), το μείγμα 3,7-*O*- β -D-διγλυκοσιδών ισοραμνετίνης και καιμπφερόλης (P17), η 1,2,3,4-τετρα-*O*-γαλλοϋλο- β -D-γλυκοπυρανόση (P20), το 3,3',4'-τριμεθοξυ-4-σουλφοξυελλαγικό οξύ (P27) και το 3,3'-διμεθοξυ-4-σουλφοξυελλαγικό οξύ (P28) επέδειξαν μέτρια αναστολή της AChE με τη μέθοδο Ellman's (75 $\mu\text{g/mL}$: (P4) $28.85 \pm 0.91\%$, (P5) $19.99 \pm 2.42\%$, (P6) $29.51 \pm 0.79\%$, (P7, 8) $35.44 \pm 0.79\%$, (P10) $25.48 \pm 0.79\%$, (P20) $33.93 \pm 0.32\%$, 100 $\mu\text{g/mL}$: (P17) $10.55 \pm 1.32\%$, (P27) $29.68 \pm 0.06\%$, (P28) 27.16 ± 1.07). Σημαντική αναστολή της AChE (100 $\mu\text{g/mL}$, $81.55 \pm 1.11\%$) επέδειξε το παράγωγο ελλαγικού οξέος P28, με τη μέθοδο NA-FBB.

Στη δοκιμασία αναστολής της υαλουρονιδάσης η παιωνιφλοριγενόννη (P1), το μείγμα των δύο διγαλλικών μεθυλεστέρων (P2, P3), ο 3-*O*- α -αραβινοπυρανοσίδης της κερκετίνης (P6), ο 3-*O*-σοφοροσίδης της λιμοσιτρίνης (P11), η παιωνιφλορίνη (P21) και η αλμπιφλορίνη (P22) δεν ήταν δραστικές ουσίες. Ο γαλλικός μεθυλεστέρας (P4), ο 3-*O*- α -αραβινοπυρανοσίδης της καιμπφερόλης (P5), το μείγμα των δύο διγαλλικών οξέων (P7, P8), ο 3-*O*-σοφοροσίδης της 8-μεθοξυκαιμπφερόλης (P10), ο 3-*O*-νεοεσπεριδοσίδης της κερκετίνης (P16), το μείγμα 3,7-*O*- β -D-διγλυκοσιδών ισοραμνετίνης και καιμπφερόλης (P17), η 1,2,3,4-τετρα-*O*-γαλλοϋλο- β -D-γλυκοπυρανόση (P20), το βενζοϊκό οξύ (P23) και η παιωνιλακτόνη Β (P24) εμφάνισαν μέτρια δράση (P4:75 $\mu\text{g/mL}$, 25.83 ± 0.76 , P5:75 $\mu\text{g/mL}$, $29.45 \pm 1.52\%$, P7, P8:75 $\mu\text{g/mL}$, $32.29 \pm 1.14\%$, P10:75 $\mu\text{g/mL}$, $57.04 \pm 1.07\%$, P16:100 $\mu\text{g/mL}$, $30.13 \pm 2.50\%$, P17:100 $\mu\text{g/mL}$, $55.26 \pm 7.67\%$, P20: 75 $\mu\text{g/mL}$, $34.93 \pm 5.36\%$, P23:100 $\mu\text{g/mL}$, $40.31 \pm 2.84\%$, P24:100 $\mu\text{g/mL}$, $29.12 \pm 9.03\%$). Από τα παράγωγα του ελλαγικού οξέος, μόνο το P28 εμφάνισε μέτρια αναστολή της Hyal (100 $\mu\text{g/mL}$, $33.33 \pm 3.64\%$). Την ισχυρότερη δράση εμφάνισε η 1,2,3,4,6-πεντα-*O*-γαλλοϋλο- β -D-γλυκοπυρανόση (P9) της οποίας η IC_{50} υπολογίστηκε στα 7.07 $\mu\text{g/mL}$.

Συμπερασματικά, η 1,2,3,4,6-πεντα-*O*-γαλλοϋλο- β -D-γλυκοπυρανόση (P9) επέδειξε τη

σημαντικότερη δράση ενάντια στην AChE. Η συγκεκριμένη ουσία, όπως έχει αναλυθεί παραπάνω, αποτελεί ένα γνωστό ισχυρό αναστολέα της AChE, που συγχρόνως εμφανίζει πολλαπλές αξιοσημείωτες δράσεις όπως αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, νευροπροστατευτική, ανασταλτική της συσσώρευσης πλακών β αμυλοειδούς, οι οποίες σε συνδυασμό με την απουσία ηπατοτοξικότητας και το βαθμό λιποφιλίας, καθιστούν την ουσία ένα σοβαρό υποψήφιο παράγοντα για το σχεδιασμό φαρμάκων για την αντιμετώπιση της νόσου Alzheimer και σχετικών μορφών άνοιας. Επιπροσθέτως οι γαλλοτανίνες και κυρίως η 1,2,3,4,6-πεντα-*O*-γαλλοϋλο-β-D-γλυκοκυρανόση (P9) συνιστούν δραστικούς Hgal αναστολείς, όπως φάνηκε και στην παρούσα μελέτη. Ως αναστολέας της Hgal μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία παθήσεων όπως αρθρίτιδα, φλεγμονή και αντιδράσεις υπερευαισθησίας. Το βενζοϊκό οξύ (P25), και ειδικότερα τα υδροξυλιωμένα παράγωγά του όπως το γαλλικό οξύ (P12), τα οποία εμφάνισαν σημαντική AChE αναστολή, θεωρούνται υποσχόμενες ενώσεις-οδηγούς για την ανάπτυξη αποτελεσματικών AChE αναστολέων⁴⁴². Οι ουσίες P4 (γαλλικός μεθυλεστέρας), P25, P12 αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως αδύναμοι hgal αναστολείς¹¹⁴. Όσον αφορά τα μονοτερπένια που φέρουν "cage-like" σκελετό πινανίου, όπως η παιωνιφλοριγενόνη (P1), δεν υπάρχουν μελέτες που να εξετάζουν την επίδρασή τους στην AChE, αν και έχει δειχθεί ότι η ουσία P1 αποτελεί έναν αποπολωτικό νευρομυϊκό αποκλειστή ο οποίος μιμείται τη δράση της σουκινυλοχολίνης. Η παιωνιλακτόνη B (P26) δεν έχει προηγουμένως ελεγχθεί σε βιοδοκιμασίες αναστολής της AChE, αν και παράγωγο αυτής, η παιωνιλακτόνη C, έδειξε ισχυρότερη νευροπροστατευτική δράση ενάντια στη ROS κυτταροτοξικότητα σε σχέση με την ουσία P26 σε κύτταρα εγκεφαλικού φλοιού επίμυων. Αυτό πιθανόν συμβαίνει λόγω της παρουσίας της βενζοϋλο ομάδας⁶¹³. Το γλυκοζυλιωμένο μονοτερπένιο παιωνιφλορίνη (P23), που αποτελεί τον πιο κοινό μεταβολίτη του γένους, έχει εμφανίσει πλήθος ευεργετικών δράσεων σε παθήσεις του ΚΝΣ, οι οποίες έχουν περιγραφεί στην αντίστοιχη παράγραφο. Μάλιστα μελέτη έδειξε ότι ο σκελετός παιωνιφλορίνης φαίνεται να είναι περισσότερο απαραίτητος για τον κατευνασμό της απώλειας μνήμης που επάγεται από τη σκοπολαμίνη σε σύγκριση με το σκελετό αλμπιφλορίνης⁶¹⁴. Η παιωνιφλορίνη πιστεύεται ότι έχει θεραπευτική επίδραση στην αντιμετώπιση της γεροντικής άνοιας και στη νοητική δυσλειτουργία της μνήμης που προκαλείται από το γήρας μέσω διαφόρων μονοπατιών όπως η προστασία εναντίων της νευροτοξικότητας που προκαλείται από τη συσσώρευση των πλακών αμυλοειδούς⁶¹⁵. Η αλμπιφλορίνη (P24), ομοίως, ασκεί νευροπροστατευτική δράση μέσω αναστολής της συσσώρευσης πλακών β αμυλοειδούς. Έτσι παρά το γεγονός ότι τα χαρακτηριστικά μονοτερπένια της παιωνίας δεν

επέδειξαν αξιοσημείωτη αναστολή της AChE, θεωρούνται υποψήφιες ενώσεις για την αντιμετώπιση της άνοιας και γενικότερα των διαταραχών της μνήμης λόγω του ότι εμφανίζουν διαφορετικούς τύπους νευροπροστασίας και έχουν την ικανότητα να κατευνάζουν τις βλάβες που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες στη νόσο Alzheimer. Οι ίδιες ουσίες (P1, P23, P24, P26) δε χαρακτηρίζονται ισχυροί Hyal αναστολείς, αν και οι αντι-αλλεργικές, αντιφλεγμονώδεις, κυτταροτοξικές ιδιότητες και η ευεργετική επίδραση σε παθήσεις όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα είναι γνωστές³⁷⁸. Φλαβονοειδή που φέρουν ελεύθερη υδροξυλομάδα στη θέση 3 αποτελούν πιο ισχυρούς αναστολείς της AChE σε σύγκριση με παράγωγα που έχουν γλυκοζυλιωμένο το υδροξύλιο της θέσης 3, όπως τα φλαβονοειδή (P5, P6, P10, P11, P13, P14, P15, P17, P19, P20, P21) που απομονώθηκαν από το υδατομεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων της *P. parnassica* (PPAC). Ωστόσο δεν υπάρχει διαφορά σε παράγωγα όπως λουτεολίνη και απιγενίνη, που έχουν ή όχι υδροξύλιο στη 3 θέση. Η ακορεστότητα του C-δακτυλίου φαίνεται ότι ενισχύει τη δράση⁶¹⁶. Η κερκετίνη, που αποτελεί γνωστό AChE αναστολέα⁶¹⁷, έχει δειχθεί ότι δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με τις αλληλουχίες αμινοξέων στην ανιονικό τμήμα της AChE⁶¹⁸. Επιπλέον η κερκετίνη έχει επιδείξει ισχυρότερη δράση από την καμπφερόλη⁶¹⁹. Συνοψίζοντας, η θέση των υδροξυλομάδων και η κατάσταση οξείδωσης του C δακτυλίου των φλαβονοειδών καθορίζουν την αποτελεσματικότητα της αναστολής της AChE. Οι υδροξυλομάδες του A δακτυλίου στις θέσεις 5, 6 και 7 είναι σημαντικές για την εκδήλωση ισχυρής αναστολής της AChE. Ειδικότερα η απουσία ελεύθερης υδροξυλομάδας στη θέση 7 οδηγεί σε μη μετρήσιμη δράση επί της AChE. Στην περίπτωση της αναστολής της Hyal έχει αποδειχθεί ότι τα φλαβονοειδή επιδεικνύουν τη μέγιστη δράση όταν βρίσκονται υπό μορφή άγλυκου παρά γλυκοζυλιωμένου παραγώγου όπως επίσης σημαντικά είναι ο διπλός δεσμός μεταξύ C-2 και C-3 και οι ελεύθερες υδροξυλομάδες των θέσεων 3' και 4'^{620 621}. Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι φλαβονοειδή όπως η καμπφερόλη έχουν δείξει *in vitro* αναστολή της Hyal που έχει απομονωθεί από δηλητήριο και καθυστέρηση της εξάπλωσης των τοξινών *in vivo*, ενώ άλλα φλαβονοειδή όπως ναρινγενίνη, κατεχίνη και γλυκοσίδες αυτών δεν εμφανίζουν καμία δράση. Επίσης φλαβονοειδή με μη υποκατεστημένες υδροξυλομάδες στους C-5, C-7 και C-4' και διπλό δεσμό μεταξύ των C-2 και C-3 είναι ισχυρότεροι αναστολείς Hyal δηλητηρίου οφιοειδών⁶²¹. Η λαρισιρεσινόλη έχει δειχθεί ότι δεν εμφανίζει ανασταλτική AChE δράση^{622 609}.

14.4 Συμπεράσματα

Στην περίπτωση της είδους *Paeonia parnassica*, το οποίο αποτελεί ένα σπάνιο ελληνικό ενδημικό αγριολούλουδο, παρασκευάστηκαν άπολα και πολικά εκχυλίσματα τόσο από τις ρίζες όσο και από τα υπέργεια τμήματα αλλά και εκχυλίσματα ριζών με την τεχνική SFE. Στόχος ήταν να ληφθεί όσο το δυνατόν πληρέστερη εικόνα του χημικού προφίλ του φυτού. Οι περιεχόμενοι δευτερογενείς μεταβολίτες των εκχυλισμάτων αξιολογήθηκαν με HPTLC και LC-MS τεχνικές. Παράλληλα πραγματοποιήθηκε έλεγχος της βιολογικής δράσης των ολικών εκχυλισμάτων. Όσον αφορά την κυτταροτοξική δράση, στην αξιολόγηση τόσο των 24 όσο και των 72 ωρών, σημαντικά αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στην περίπτωση των εκχυλισμάτων των ριζών που παραλήφθηκαν με την τεχνική SFE, αλλά και στο υδατοαλκοολικό εκχύλισμα των ριζών (PPRC) έναντι της σειράς MCF-7. Στον έλεγχο ικανότητας ενζυμικής αναστολής, τα υδατοαλκοολικά εκχυλίσματα των ριζών (PPRC) και των υπέργειων τμημάτων (PPAC) παρουσίασαν αξιοσημείωτες δράσεις. Συγκεκριμένα στον έλεγχο ικανότητας αναστολής της AChE με τη μέθοδο NA-FBB το PPRC προκάλεσε $75.71 \pm 1.02\%$ αναστολή, ενώ και με τη μέθοδο Ellman's, $40.07 \pm 1.36\%$. Το εκχύλισμα PPAC, το οποίο ελέγχθηκε με τη μέθοδο Ellman's, επέδειξε $42.35 \pm 0.89\%$ αναστολή της AChE. Επίσης το υδατομεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του είδους ανέστειλε τη δράση της Hyal κατά $56.35 \pm 3.10\%$, ενώ της ρίζας κατά $33.56 \pm 0.69\%$.

Εν συνεχεία τα εκχυλίσματα PPRC και PPAC κλασματώθηκαν με την τεχνική του CPC και μελετήθηκαν φυτοχημικά τόσο μέσω του στατιστικού μοντέλου HetCA, όσο και με την κλασική μέθοδο. Από τη HetCA επεξεργασία του εκχυλίσματος PPRC, και στους δύο ενζυμικούς στόχους (AChE, Hyal), έγινε δυνατή η ανίχνευση της σημαντικής συνεισφοράς στη δράση των παραγώγων της 1,2,3,4,6-πενταγαλλικής γλυκόζης αλλά και πιο απλών παραγώγων γαλλικού οξέος. Επίσης φάνηκε ότι τα παράγωγα παιωνιφλορίνης (μονοτερπένια cage-like), τα οποία είναι άφθονα σε αυτό το εκχύλισμα, δε συμβάλλουν στη δράση. Από τη HetCA επεξεργασία του εκχυλίσματος PPAC, έγινε αντιληπτό ότι οι ίδιες ουσίες, σε σχέση με το παραπάνω εκχύλισμα, είναι υπεύθυνες για τη δράση, ενώ τα φλαβονοειδή τα οποία βρίσκονται σε μεγάλα ποσοστά στο παρασκεύασμα, δε φαίνεται να φέρουν κάποια δράση.

Μέσω της κλασικής φυτοχημικής προσέγγισης και των χρωματογραφικών διαχωρισμών των ουσιών των κλασμάτων του εκχυλίσματος PPAC, παραλήφθηκαν 19 δευτερογενείς μεταβολίτες. Αυτοί ανήκουν στις κατηγορίες των φαινολικών, όπως π.χ. γαλλικός μεθυλεστέρας, 1,2,3,4,6-πενταγαλλική γλυκόζη, των γλυκοζυλιωμένων φλαβονοειδών π.χ. 3-O-α-

αραβινοπυρανοσίδης της καιμπφερόλης και των μονοτερπενίων π.χ. παιωνιφλοριγενόνη, Από το εκχύλισμα PPRC, με τους ίδιους τρόπους, παραλήφθηκαν 9 διαφορετικές ουσίες και 4 κοινές. Οι διαφορετικές, σε σχέση με το εκχύλισμα PPAC, ουσίες ανήκουν στις κατηγορίες των γαλλικών οξέων (1,2,3,4-τετρα-*O*-γαλλοϋλο-β-D-γλυκοπυρανόση) και των χαρακτηριστικών cage-like μονοτερπενίων που απαντώνται στην οικογένεια *Raeoniaceae* όπως είναι η παιωνιφλορίνη, η οξυπαιωνιφλορίνη κ.ά. Ακόμη παραλήφθηκαν η λαρισρεσινόλη, που ανήκει στα λιγνάνια και δύο παράγωγα ελλαγικού οξέος. Στις ουσίες που υπήρχε ικανοποιητική ποσότητα πραγματοποιήθηκε βιολογικός έλεγχος ως προς την ικανότητα αναστολής των ενζύμων AChE και Hyal. Στον έλεγχο αναστολής της AChE, με τη μέθοδο Ellman's, αναδείχθηκε η ισχυρή δράση των ουσιών, 1,2,3,4,6-πεντα-*O*-γαλλοϋλο-β-D-γλυκοπυρανόση (P9), γαλλικό οξύ (P12) και βενζοϊκό οξύ (P23) όπου κατασκευάστηκαν καμπύλες συγκέντρωσης-αναστολής και υπολογίστηκαν οι τιμές IC₅₀. Ακόμη στη βιοδοκιμασία αναστολής της AChE, με τη μέθοδο NA-FBB, οι μεταβολίτες 1,2,3,4,6-πεντα-*O*-γαλλοϋλο-β-D-γλυκοπυρανόση (P9) και γαλλικό οξύ (P12) επέδειξαν ισχυρή δράση. Στη δοκιμασία αναστολής της Hyal ουσίες όπως ο γαλλικός μεθυλεστέρας (P4), ο 3-*O*-αραβινοπυρανοσίδης της καιμπφερόλης (P5) και η παιωνιλακτόνη Β (P24) εμφάνισαν μέτρια δράση. Από τα παράγωγα του ελλαγικού οξέος, μόνο το P28 εμφάνισε μέτρια αναστολή της Hyal (100 μg/mL, 33.33±3.64%). Την ισχυρότερη δράση εμφάνισε η 1,2,3,4,6-πεντα-*O*-γαλλοϋλο-β-D-γλυκοπυρανόση (P9) της οποίας η IC₅₀ υπολογίστηκε στα 7.07 μg/mL.

Συνοψίζοντας, τα εκχυλίσματα της *Paeonia parnassica* παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως προς τους περιεχόμενους μεταβολίτες αλλά και ως προς τη δράση. Η HetCA επεξεργασία που πραγματοποιήθηκε οδήγησε σε ασφαλή συμπεράσματα ως προς το ποιες είναι οι ουσίες που συνεισφέρουν στη δράση, ποιες ουσίες είναι πιθανά λιγότερο δραστικές και τι κατηγορίες ουσιών περιέχονται στο εκχύλισμα. Η φυτοχημική μελέτη των δύο εκχυλισμάτων επιβεβαίωσε τα HetCA αποτελέσματα και οδήγησε στην απομόνωση 28 δευτερογενών μεταβολιτών, από τους οποίους ορισμένοι παρουσιάζουν αξιοσημείωτες ενζυμικές αναστολές.

14.5 Βιβλιογραφία

372. Li, C. *et al.* The Root Bark of *Paeonia moutan* is a Potential Anticancer Agent in Human Oral Squamous Cell Carcinoma Cells. *Anticancer Res.* 32, 2625–2630 (2012).
373. Gao, Y. & He, C. Anti-proliferative and anti-metastasis effects of ten oligostilbenes from the seeds of *Paeonia suffruticosa* on human cancer cells. *Oncol. Lett.* 13, 4371–4377 (2017).
374. Li, P. *et al.* Monoterpene derivatives from the roots of *Paeonia lactiflora* and their anti-proliferative

- activity. *Fitoterapia* 98, 124–129 (2014).
375. Lin, M. Y. *et al.* Anti-tumor effect of Radix Paeoniae Rubra extract on mice bladder tumors using intravesical therapy. *Oncol. Lett.* 12, 904–910 (2016).
376. Kim, H. J. *et al.* Cytotoxic and antimutagenic stilbenes from seeds of *Paeonia lactiflora*. *Arch. Pharm. Res.* 25, 293–299 (2002).
377. Ravipati, A. S. *et al.* Anti-proliferative activities of selected Chinese medicinal herbs against human cancer cell lines. 4, 206–219 (2013).
378. He, C. N. *et al.* Phytochemical and biological studies of Paeoniaceae. *Chem. Biodivers.* 7, 805–838 (2010).
379. Tzanoudakis, D., Rix, M. 858. *Paeonia parnassica*. *Curtis's Bot. Mag.* 34, 41–50 (2017).
380. Τζανουδάκης, Δ. *Κυτταρολογική μελέτη του γένους Paeonia L. εν Ελλάδα*. (1977).
381. *Βιβλίο ερυθρών δεδομένων των σπανίων & απειλούμενων φυτών της Ελλάδας*. (2009).
382. Centre, E. T. Assessment of conservation status at the European biogeographical level. European Environment Agency 1–6 (2012).
383. Bazos, I. & Delipetrou, P. *Paeonia parnassica*. The IUCN Red List of Threatened Species 2011: e.T162095A5535177. (2011). at <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-1.RLTS.T162095A5535177.en>>. Downloaded on 20 June 2019.
384. Baumann, H. *Greek Wild Flowers and Plant Lore in Ancient Greece*. (Herbert Press, 1996).
385. Καββαδάς, Δ. *Εικονογραφημένον Βοτανικόν Φυτολογικόν Λεξικόν, Τόμος ΣΤ*. (1936).
386. Stearn, W. T., Davis, P. & Γουλανδρή, Ν. *Παιώνιες της Ελλάδας - ταξινομική και ιστορική μελέτη του γένους Paeonia*. (1984).
387. Papandreou, V. *et al.* Volatiles with antimicrobial activity from the roots of Greek Paeonia taxa. *J. Ethnopharmacol.* 81, 101–104 (2002).
388. Kritsanida, M., Magiatis, P., Skaltsounis, A.-L. & Stables, J. P. Phytochemical investigation and anticonvulsant activity of *Paeonia parnassica* radix. *Nat. Prod. Commun.* 2, 351–356 (2007).
389. Wu, S.-H., Wu, D.-G. & Chen, Y.-W. Chemical Constituents and Bioactivities of Plants from the Genus *Paeonia*. *Chem. Biodivers.* 7, 90–104 (2010).
390. Cseke, L. J. *et al.* *Natural Products from Plants*. (Taylor & Francis, 2006).
391. Crozier, A., Clifford, M. N. & Ashihara, H. *Plant Secondary Metabolites. Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. (Blackwell Publishing, 2006).
392. De Cássia Da Silveira E Sá, R., Andrade, L. N. & De Sousa, D. P. A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. *Molecules* 18, 1227–1254 (2013).

393. Koziol, A. *et al.* An Overview of the Pharmacological Properties and Potential Applications of Natural Monoterpenes. *Mini-Reviews Med. Chem.* 14, 1156–1168 (2015).
394. Shi, Y. H. *et al.* Characterization and quantification of monoterpenoids in different types of peony root and the related *Paeonia* species by liquid chromatography coupled with ion trap and time-of-flight mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 129, 581–592 (2016).
395. Pedreno, M. A. Plant stilbenes: Recent advances in their chemistry and biology. *Medi* 599, (2011).
396. Chong, J., Poutaraud, A. & Huguene, P. Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Sci.* 177, 143–155 (2009).
397. Shashank, K. & Pandey, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids. *Hindawi Sci. World J.* 2013, 533–548 (2013).
398. Ren, Y. & Chen, X. Distribution, bioactivities and therapeutical potentials of pentagalloyl-glucopyranose. *Curr. Bioact. Compd.* 3, 81–89 (2007).
399. Chung, K. T., Wong, T. Y., Wei, C. I., Huang, Y. W. & Lin, Y. Tannins and human health: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 38, 421–464 (1998).
400. Manuscript, A. & Magnitude, S. NIH Public Access. 31, 1713–1723 (2013).
401. Okuda, T. & Ito, H. Tannins of constant structure in medicinal and food plants-hydrolyzable tannins and polyphenols related to tannins. *Molecules* 16, 2191–2217 (2011).
402. Hagerman, A. E. Purification of Gallotannins. 1 (2010). at <papers2://publication/uuid/163652A6-681E-426D-8C9E-C3D3C9735440>. The Tannin Handbook
403. Nishizawa, M., Yamagishi, T., Nonaka, G. & Nishioka, I. Structure of gallotannins in *Paeoniae radix*. *Chem. Pharm. Bull.* 28, 2850–1852 (1980).
404. Ahmad, F., Tabassum, N. & Rasool, S. Medicinal uses and phytoconstituents of *Paeonia officinalis*. 1–4 (2015).
405. Kim, M., Lim, S. J., Oidovsambuu, S. & Nho, C. W. Gnetin H isolated from *Paeonia anomala* inhibits FcεRI-mediated mast cell signaling and degranulation. *J. Ethnopharmacol.* 154, 798–806 (2014).
406. Guangzhou. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China (English ed.)*. (Guangdong Science and Technology Press, 1992).
407. Cai, Y. *et al.* Assessment of the Therapeutic Effect of Total Glucosides of Peony for Juvenile Idiopathic Arthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 2016, (2016).
408. Parker, S. *et al.* A Pharmacological Review of Bioactive Constituents of *Paeonia lactiflora* Pallas and *Paeonia veitchii* Lynch. *Phyther. Res.* 1445–1473 (2016). doi:10.1002/ptr.5653
409. Fujiwara, H. *et al.* A traditional medicinal herb *Paeonia suffruticosa* and its active constituent 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-d-glucopyranose have potent anti-aggregation effects on Alzheimer's

amyloid β proteins in vitro and in vivo. *J. Neurochem.* 109, 1648–1657 (2009).

410. Qiu, F., Zhong, X., Mao, Q. & Huang, Z. The antidepressant-like effects of paeoniflorin in mouse models. *Exp. Ther. Med.* 5, 1113–1116 (2013).
411. Ngan, L. T. M., Moon, J. K., Shibamoto, T. & Ahn, Y. J. Growth-inhibiting, bactericidal, and urease inhibitory effects of *Paeonia lactiflora* root constituents and related compounds on antibiotic-susceptible and -resistant strains of helicobacter pylori. *J. Agric. Food Chem.* 60, 9062–9073 (2012).
412. He, C., Zhang, Y., Peng, Y., Yang, J. & Xiao, P. Monoterpene glycosides from the seeds of *Paeonia suffruticosa* protect HEK 293 cells from irradiation-induced DNA damage. *Phytochem. Lett.* 5, 128–133 (2012).
413. Biologically active principles of crude drugs II Anti-allergic principles in SHOSEIRYU-TO anti-inflammatory properties of paeoniflorin and its derivatives. *J. Pharmacobiodyn.* 40, 1569–1572 (1992).
414. Liu, J. *et al.* Hypoglycemic and Antioxidant Activities of Paeonol and Its Beneficial Effect on Diabetic Encephalopathy in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J. Med. Food* 16, 577–586 (2013).
415. Picerno, P. *et al.* Screening of a polar extract of *Paeonia rockii*: Composition and antioxidant and antifungal activities. *J. Ethnopharmacol.* 138, 705–712 (2011).
416. Asmi, K. S., Lakshmi, T., Balusamy, S. R. & Parameswari, R. Therapeutic aspects of taxifolin - An update. *J. Adv. Pharm. Educ. Res.* 7, 187–189 (2017).
417. Yuk, H. J. *et al.* Profiling of neuraminidase inhibitory polyphenols from the seeds of *Paeonia lactiflora*. *Food Chem. Toxicol.* 55, 144–149 (2013).
418. Kadota, S., Terashima, S., Basnet, P., Kikuchi, T. & Namba, T. Palbinone, a Novel Terpenoid from *Peonia-albiflora* - Potent Inhibitory Activity on 3-Alpha-Hydroxysteroid Dehydrogenase. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 41, 487–490 (1993).
419. Ohta, H., Matsumoto, K., Shimizu, M. & Watanabe, H. Paeoniflorin attenuates learning impairment of aged rats in operant brightness discrimination task. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49, 213–217 (1994).
420. Lin, J. *et al.* Total glucosides of paeony inhibits Th1/Th17 cells via decreasing dendritic cells activation in rheumatoid arthritis. *Cell. Immunol.* 280, 156–163 (2012).
421. Woo, W. *et al.* A review of research on plants for fertility regulation in Korea. *Korean J. Pharmacogn.* 12, 153–170 (1981).
422. Keys, J. Chinese herbs, their botany, chemistry and pharmacodynamics. (Rutland, VT, CE Tuttle, 1976).
423. Medicines Agency, E. Assessment report on *Paeonia lactiflora* Pallas, radix (Paeoniae radix alba). 44, (2016).
424. Wang, X. *et al.* Isolation and purification of four flavonoid constituents from the flowers of *Paeonia*

- suffruticosa* by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* 1075, 127–131 (2005).
425. Shimizu, M., Hayashi, T., Morita, N., Kimura, I. & Kimura, M. Paeoniflorigenone, a new monoterpene from paeony roots. *J. Chromatogr. A* 22, 3069–3070 (1981).
 426. Papandreou, V., Magiatis, P., Kalpoutzakis, E., Skaltsounis, A. L. & Harvala, C. Paeonicluside, a new salicylic glycoside from the greek endemic species *Paeonia clusii*. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 57, 235–238 (2002).
 427. Kim, S. H. *et al.* Chemical constituents isolated from *Paeonia lactiflora* roots and their neuroprotective activity against oxidative stress in vitro. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 24, 1138–1140 (2009).
 428. Huang, Y., Ohno, O., Suenaga, K. & Miyamoto, K. Apoptosis-inducing activity and antiproliferative effect of Paeoniflorigenone from moutan cortex. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 81, 1106–1113 (2017).
 429. Duan, W. J. *et al.* Monoterpenes from *Paeonia albiflora* and their inhibitory activity on nitric oxide production by lipopolysaccharide-activated microglia. *J. Nat. Prod.* 72, 1579–1584 (2009).
 430. Kimura, M. *et al.* Blocking Paeony Effects of a New Component , Paeoniflorigenone, in Paeony Root on Neuromuscular Junctions of Frogs and Mice. *Jpn. J. Pharmacol.* 35, 61–6 (1984).
 431. Kimura, I. Depolarizing Neuromuscular Blocking Action Induced by Electropharmacological Coupling in the Combined effect of paeoniflorin and Glycyrrhizin. *Jpn J Pharmacol* 37:395-399 (1985).
 432. Koo, Y. *et al.* Platelet anti-aggregatory and blood anti-coagulant effects of compounds isolated from *Paeonia lactiflora* and *Paeonia suffruticosa*. *Pharmazie* 65, 624–8 (2010).
 433. Horgen, F. D. *et al.* Isolation of gallic acid esters as antiplasmodial constituents of *Swintonia foxworthyi* (Anacardiaceae). *Phytomedicine* 4, 353–6 (1997).
 434. Li, J., Kuang, G., Chen, X. & Zeng, R. Identification of chemical composition of leaves and flowers from *Paeonia rockii* by UHPLC-Q-Exactive Orbitrap HRMS. *Molecules* 21, (2016).
 435. Abu-Reidah, I. M., Ali-Shtayeh, M. S., Jamous, R. M., Arráez-Román, D. & Segura-Carretero, A. HPLC-DAD-ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. *Food Chem.* 166, 179–191 (2015).
 436. Konishi, E. & Hotta, S. Effects of tannic acid and its related compounds upon Chikungunya virus. *Microbiol Immunol* 23, 659–667 (1979).
 437. Nishizawa, M., Yamagishi, T., Nonaka, G. & Nishioka, I. Tannins and Related Compounds. Part 5.' Isolation and Characterization of Polygalloylglucoses from Chinese Gallotannin. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 2963–2968 (1982). doi:10.1039/P19820002963
 438. Kamatham, S., Kumar, N. & Gudipalli, P. Isolation and characterization of gallic acid and methyl gallate from the seed coats of *Givotia rottleriformis* Griff. and their anti-proliferative effect on human epidermoid carcinoma A431 cells. *Toxicol. Reports* 2, 520–529 (2015).
 439. Enkhtuya, E., Shimamura, T., Kashiwagi, T. & Ukeda, H. Antioxidative Constituents in the Leaves of *Paeonia anomala* Grown in Mongolia. *Food Sci. Technol. Res.* 23, 63–70 (2017).
 440. Se, J. K. *et al.* Effects of methyl gallate on arachidonic acid metabolizing enzymes: Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase in mouse bone marrow-derived mast cells. *Arch. Pharm. Res.* 29, 874–878 (2006).

441. Kane, C. J. M., Menna, J. H., Sung, C. C. & Yeh, Y. C. Methyl gallate, methyl-3,4,5-trihydroxybenzoate, is a potent and highly specific inhibitor of herpes simplex virus in vitro. II. Antiviral activity of methyl gallate and its derivatives. *Biosci. Rep.* 8, 95–102 (1988).
442. Santa-artharnpreecha, S., Samakthanasan, S., Kitphati, W. & Pratuangdejkul, J. Gallic acid and derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. *Thai J Pharm Sci* 36, 35–37 (2012).
443. Gudej, J. Kaempferol and quercetin glycosides from *Rubus idaeus* L. leaves. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research* 60, 313–316 (2003).
444. De Almeida, A. P. *et al.* Flavonol monoglycosides isolated from the antiviral fractions of *Persea americana* (Lauraceae) leaf infusion. *Phyther. Res.* 12, 562–567 (1998).
445. Chonghui, L. *et al.* Flavonoid composition and antioxidant activity of tree peony (*Paeonia section moutan*) yellow flowers. *J. Agric. Food Chem.* 57, 8496–8503 (2009).
446. Badgujar, S. B., Patel, V. V. & Bandivdekar, A. H. *Foeniculum vulgare* Mill: A review of its botany, phytochemistry, pharmacology, contemporary application, and toxicology. *Biomed Res. Int.* **2014**, (2014).
447. Shafek, R. E., Shafik, N. H. & Michael, H. N. Antibacterial and antioxidant activities of two new kaempferol glycosides isolated from *solenostemma argel* stem extract. *Asian Journal of Plant Sciences* 11, 143–147 (2012).
448. Loizzo, M., Tundis, R., Menichini, F., Statti, G. & Menichini, F. Hypotensive Natural Products: Current Status. *Mini-Reviews Med. Chem.* 8, 828–855 (2008).
449. Kang, Y.-H. & Howard, L. R. Phenolic Composition and Antioxidant Activities of Different Solvent Extracts from Pine Needles in *Pinus* Species. *Prev. Nutr. Food Sci.* 15, 36–43 (2010).
450. Da Silva Sa, F. A. *et al.* Phytochemical analysis and antimicrobial activity of *Myrcia tomentosa* (Aubl.) DC. leaves. *Molecules* 22, 1–10 (2017).
451. Renda, G. *et al.* Bioassay guided isolation of active compounds from *Alchemilla barbatiflora* Juz. *Rec. Nat. Prod.* 12, 76–85 (2018).
452. Lee, S. S., Tseng, C. C. & Chen, C. K. Three new benzophenone glucosides from the leaves of *Planchonella obovata*. *Helv. Chim. Acta* 93, 522–529 (2010).
453. Park, K. Y. *et al.* Inhibitory effect of luteolin 4'-O-glucoside from *Kummerowia striata* and other flavonoids on interleukin-5 bioactivity. *Planta Med.* 65, 457–459 (1999).
454. Mothana, R. A. A. *et al.* Anti-inflammatory, antinociceptive, antipyretic and antioxidant activities and phenolic constituents from *Loranthus regularis* Steud. ex Sprague. *Food Chem.* 130, 344–349 (2012).
455. Scognamiglio, M. *et al.* Phytochemical investigation and antimicrobial assessment of *Bellis sylvestris* leaves. *Phytochem. Lett.* 17, 6–13 (2016).
456. Verzele, M., Delahaye, P. & Van Dijck, J. Digallic acid. 92, 181–186 (1983).
457. Kim, M. S., Lee, D. Y., Sung, S. H. & Jeon, W. K. Anti-cholinesterase activities of hydrolysable tannins and polyhydroxytriterpenoid derivatives from *Terminalia chebula* Retz. fruit. *Rec. Nat. Prod.* 12, 284–289 (2018).
458. Moghadam, S. E. *et al.* Wound healing potential of chlorogenic acid and myricetin-3-o- β -rhamnoside isolated from *Parrotia persica*. *Molecules* 22, 1–15 (2017).
459. Müller-Maatsch, J., Bechtold, L., Schweiggert, R. M. & Carle, R. Co-pigmentation of pelargonidin

- derivatives in strawberry and red radish model solutions by the addition of phenolic fractions from mango peels. *Food Chem.* 213, 625–634 (2016).
460. Abou-Zaid, M. M., Lombardo, D. A. & Nozzolillo, C. Methyl gallate is a natural constituent of maple (Genus *Acer*) leaves. *Nat. Prod. Res.* 23, 1373–1377 (2009).
461. Sultanova, N. A., Abilov, Z. A., Shul'ts, E. E. & Omurkamzinova, V. B. Biologically active compounds from *Tamarix hispida*. II. *Chem. Nat. Compd.* 40, 192–193 (2004).
462. Shaalan, Y. M. *et al.* Destabilizing the interplay between miR-1275 and IGF2BPs by *Tamarix articulata* and quercetin in hepatocellular carcinoma. *Nat. Prod. Res.* 32, 2217–2220 (2018).
463. Bozorgi, M. *et al.* A Review of Their Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology. *Sci. World J.* 2013, 33 (2013).
464. An, R.-B., Oh, H. & Kim, Y.-C. Phenolic constituents of galla *Rhois* with hepatoprotective effects on tacrine- and nitrofurantoin-induced cytotoxicity in Hep G2 cells. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 2155–7 (2005).
465. Ahmed, Z. Ben *et al.* Potentially antidiabetic and antihypertensive compounds identified from *Pistacia atlantica* leaf extracts by LC fingerprinting. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 149, 547–556 (2018).
466. Cho, J. Y., Sohn, M. J., Lee, J. & Kim, W. G. Isolation and identification of pentagalloylglucose with broad-spectrum antibacterial activity from *Rhus trichocarpa* Miquel. *Food Chem.* 123, 501–506 (2010).
467. Hu, H., Chai, Y., Wang, L., Zhang, J., Lee, H.J., Kim, S-H., Lu, J.. Penta-galloyl-glucose induces autophagy and caspase-independent programmed deaths in human PC-3 and mouse TRAMP-C2 prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* 8;2833-2843 (2009)
468. Zhang, X. Q. *et al.* Anti-*Helicobacter pylori* compounds from the ethanol extracts of *Geranium wilfordii*. *J. Ethnopharmacol.* 147, 204–207 (2013).
469. Sancheti, S., Sancheti, S., Um, B. H. & Seo, S. Y. 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucose: A cholinesterase inhibitor from *Terminalia chebula*. *South African J. Bot.* 76, 285–288 (2010).
470. Cannell, R. J., Farmer, P. & Walker, J. M. Purification and characterization of pentagalloylglucose, and alpha-glucosidase inhibitor/antibiotic from the freshwater green alga *Spirogyra varians*. *Biochem. J.* 255, 937–941 (1988).
471. Mendonca, P., Taka, E., Bauer, D., Cobourne-Duval, M., Soliman, K., F.A. The attenuating effects of 1,2,3,4,6 penta-O-galloyl- β -D-glucose on inflammatory cytokines release from activated BV-2 microglial cells. *J Neuroimmunol* 305, 9–15 (2017).
472. Choi, B. M. *et al.* 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl-beta-D-glucose protects rat neuronal cells (Neuro 2A) from hydrogen peroxide-mediated cell death via the induction of heme oxygenase-1. *Neurosci. Lett.* 328, 185–189 (2002).
473. Mook-Jung, I. *et al.* Neuroprotective effects of constituents of the oriental crude drugs, *Rhodiola sacra*, *R. sachalinensis* and Tokaku-joki-to, against beta-amyloid toxicity, oxidative stress and apoptosis. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 1101–1104 (2002).
474. Fan, W., Tezuka, Y., Ni, K. M. & Kadota, S. Prolyl endopeptidase inhibitors from the underground part of *Rhodiola sachalinensis*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* 49, 396–401 (2001).
475. Kim, H.J., Jang, D.I., Choi, S.W. Inhibitors of Tyrosinase and Melanogenesis from *Galla rhois*. *Preventive Nutrition and Food Science* 2;285-290 (1997).

476. Leanpolchareanchai, J., Pithayanukul, P., Bavovada, R. & Saparpakorn, P. Molecular docking studies and anti-enzymatic activities of thai mango seed kernel extract against snake venoms. *Molecules* 14, 1404–1422 (2009).
477. Sugimoto, K. *et al.* Hydrolyzable Tannins as Antioxidants in the Leaf Extract of *Eucalyptus globulus* Possessing Tyrosinase and Hyaluronidase Inhibitory Activities. *Food Sci. Technol. Res.* 15, 331–336 (2009).
478. Kim, S., Sancheti, S. a & Sancheti, S. S. Effect of 1 , 2 , 3 , 4 , 6-Penta-O-Galloyl- β -D-Glucose on Elastase and Hyaluronidase Activities and Its Type II Collagen expression. *Acta Pol. Pharm. Res.* 67, 145–150 (2010).
479. Cao, Y. *et al.* Biological and biomedical functions of Penta-O-galloyl-D-glucose and its derivatives. *J. Nat. Med.* 68, 465–472 (2014).
480. Feldman, K. S. *et al.* In vitro and In vivo inhibition of LPS-stimulated tumor necrosis factor-alpha secretion by the gallotannin beta-D-pentagalloylglucose. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, 1813–1815 (2001).
481. Nithitanakool, S., Pithayanukul, P. & Bavovada, R. Antioxidant and hepatoprotective activities of Thai mango seed kernel extract. *Planta Med.* 75, 1118–1123 (2009).
482. Stosic, D., Gorunovic, M., Skaltsounis, A.-L., Tillequin, F. & Koch, M. 38. Nouveaux flavonosides de *Paeonia tenuifolia* L. *Helv. Chim. Acta* 71, 348–353 (1988).
483. Ferreres, F. *et al.* 8-Methoxykaempferol 3-Sophoroside, a Yellow Pigment From Almond Pollen. *Phytochemistry* 28, 1901–1903 (1989).
484. Joshi, K. R. & Devkota, H. P. Chemical Analysis of Flowers of *Bombax ceiba* from Nepal. *Nat. Prod. Commun.* 8, 583–584 (2013).
485. Wang, H. *et al.* Rhobupcyanoside B, A new cyanoside from *Rhodiola bupleuroides*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 18, 1108–1114 (2016).
486. Kurkin, V. A., Zapesochnaya, G. G. & Shchavlinskii, A. N. Flavonoids of the rhizomes of *Rhodiola rosea*. *Plenum Publ. Corp.* 1–4 (1984).
487. Dauguet, J. C., Bert, M., Dolley, J., Bekaert, A. & Lewin, G. 8-Methoxykaempferol 3-neohesperidoside and other flavonoids from bee pollen of *Crataegus monogyna*. *Phytochemistry* 33, 1503–1505 (1993).
488. Olszewska, M. A. Flavonoid profile of *Sorbus intermedia*. *Chem. Nat. Compd.* 45, 722–724 (2009).
489. Bennini, B., Chulia, A. J., Kaouadji, M. & Thomasson, F. Flavonoid glycosides from *Erica cinerea*. *Phytochemistry* 31, 2483–2486 (1992).
490. Wolbiś, M. & Królikowska, M. Flavonol glycosides from *Sedum acre*. *Phytochemistry* 27, 3941–3943 (1988).
491. Baek, J., Lee, H. L., Kang, K. S. & Kim, K. H. Chemical constituents from the fruit of citrus Unshiu and their inhibitory effects on acetylcholinesterase. *Maced. J. Chem. Chem. Eng.* 36, 1–8 (2017).
492. Manthey, J. A., Grohmann, K., Montanari, A., Ash, K. & Manthey, C. L. Polymethoxylated flavones derived from citrus suppress tumor necrosis factor- α expression by human monocytes. *J. Nat. Prod.* 62, 441–444 (1999).
493. Khushbaktova, Z. A. *et al.* Interrelationships of the structures and antioxidant activities of some flavonoids from the plants of Central Asia. *Chem. Nat. Compd.* 32, 338–343 (1996).

494. Numonov, S. *et al.* Evaluation of the antidiabetic activity and chemical composition of geranium collinum root extracts—computational and experimental investigations. *Molecules* 22, (2017).
495. Khadem, S. & Marles, R. J. Monocyclic phenolic acids; hydroxy- and polyhydroxybenzoic acids: Occurrence and recent bioactivity studies. *Molecules* 15, 7985–8005 (2010).
496. Nikolic, K. M. Theoretical study of phenolic antioxidants properties in reaction with oxygen-centered radicals. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* 774, 95–105 (2006).
497. Dalla Pellegrina, C. *et al.* Anti-tumour potential of a gallic acid-containing phenolic fraction from *Oenothera biennis*. *Cancer Lett.* 226, 17–25 (2005).
498. Kim, Y.-J. Antimelanogenic and Antioxidant Properties of Gallic Acid. *Biol. Pharm. Bull.* 30, 1052–1055 (2007).
499. Nayeem, N. & SMB, A. Gallic Acid: A Promising Lead Molecule for Drug Development. *J. Appl. Pharm.* 08, 8–11 (2016).
500. Li, J. *et al.* A norsesquiterpene lactone and a benzoic acid derivative from the leaves of *Cyclocarya paliurus* and their glucosidase and glycogen phosphorylase inhibiting activities. *Planta Med.* 74, 287–289 (2008).
501. Yuan, Z. *et al.* Flavonoids from *Potentilla parvifolia* Fisch. and Their Neuroprotective Effects in Human Neuroblastoma SH-SY5Y cells In Vitro. *ARPN J. Eng. Appl. Sci.* 12, 3218–3221 (2017).
502. Şöhretoğlu, D. *et al.* Potential of *Potentilla inclinata* and its polyphenolic compounds in α -glucosidase inhibition: Kinetics and interaction mechanism merged with docking simulations. *Int. J. Biol. Macromol.* 108, 81–87 (2018).
503. Bottone, A., Montoro, P., Masullo, M., Pizza, C. & Piacente, S. Metabolomics and antioxidant activity of the leaves of *Prunus dulcis* Mill. (Italian cvs. Toritto and Avola). *J. Pharm. Biomed. Anal.* 158, 54–65 (2018).
504. Li, H. X., Jo, E., Myung, C.-S., Kim, Y. H. & Yang, S. Y. Lipolytic effect of compounds isolated from leaves of mulberry (*Morus alba* L.) in 3T3-L1 adipocytes. *Nat. Prod. Res.* 6419, (2017).
505. Liang, X. *et al.* A Rapid Extraction and Analysis Method for the Simultaneous Determination of 26 Bioflavonoids in *Portulaca Oleracea* L. *Phytochem. Anal.* 25, 537–543 (2014).
506. Salib, J. Y. *et al.* New quinoline alkaloid from *Ruta graveolens* aerial parts and evaluation of the antifertility activity. *Nat. Prod. Res.* 28, 1335–1342 (2014).
507. Thanh, N. Van *et al.* A new flavone sulfonic acid from *Phyllanthus urinaria*. *Phytochem. Lett.* 7, 182–185 (2014).
508. Jing, W. G., Fu, J., Guo, Y. & Liu, A. Phytochemical screening of flavonoids with their antioxidant activities from rapeseed (*Brassica napus* L.). *Phytochem. Lett.* 13, 239–245 (2015).
509. Atay Balkan, I., Gören, A. C., Kirmizibekmez, H. & Yeşilada, E. Evaluation of the in vitro anti-inflammatory activity of *Nerium oleander* L. flower extracts and activity-guided isolation of the active constituents. *Rec. Nat. Prod.* 12, 128–141 (2017).
510. Warashina, T. & Miyase, T. Flavonoid Glycosides from *Sedum bulbiferum*. *Chem Pharm Bull* 65, 1199–1204 (2017).
511. Pereira, C. G. *et al.* Chemical profiling of infusions and decoctions of *Helichrysum italicum* subsp. *picardii* by UHPLC-PDA-MS and in vitro biological activities comparatively with green tea (*Camellia sinensis*) and rooibos tisane (*Aspalathus linearis*). *J. Pharm. Biomed. Anal.* 145, 593–603 (2017).

512. Yang, R. *et al.* Antioxidant capacity of phenolics in *Camellia nitidissima* Chi flowers and their identification by HPLC Triple TOF MS/MS. *PLoS One* 13, 1–20 (2018).
513. Gao, D. F., Xu, M., Yang, C. R., Xu, M. & Zhang, Y. J. Phenolic antioxidants from the leaves of *Camellia papyandra* Hu. *J. Agric. Food Chem.* 58, 8820–8824 (2010).
514. Soberón, J. R., Sgariglia, M. A., Sampietro, D. A., Quiroga, E. N. & Vattuone, M. A. Free radical scavenging activities and inhibition of inflammatory enzymes of phenolics isolated from *Tripodanthus acutifolius*. *J. Ethnopharmacol.* 130, 329–333 (2010).
515. Morikawa, T. *et al.* Dimeric pyrrolidinoindoline-type alkaloids with melanogenesis inhibitory activity in flower buds of *Chimonanthus praecox*. *J. Nat. Med.* 68, 539–549 (2014).
516. Kim, M. Y., Kim, Y. C. & Chung, S. K. Identification and in vitro biological activities of flavonols in garlic leaf and shoot: Inhibition of soybean lipoxygenase and hyaluronidase activities and scavenging of free radicals. *J. Sci. Food Agric.* 85, 633–640 (2005).
517. Jeong, H. J. *et al.* Neuraminidase inhibitory activities of flavonols isolated from *Rhodiola rosea* roots and their in vitro anti-influenza viral activities. *Bioorganic Med. Chem.* 17, 6816–6823 (2009).
518. Hasle Enerstvedt, K., Lundberg, A. & Jordheim, M. Characterization of Polyphenolic Content in the Aquatic Plants *Ruppia cirrhosa* and *Ruppia maritima* -A Source of Nutritional Natural Products. *Molecules* 23, (2017).
519. Ma, X. *et al.* Two new megastigmanes from Chinese traditional medicinal plant *Sedum sarmentosum*. *Nat. Prod. Res.* 31, 1473–1477 (2017).
520. Ryu, B. *et al.* New Flavonol Glucuronides from the Flower Buds of *Syzygium aromaticum* (Clove). *J. Agric. Food Chem.* 64, 3048–3053 (2016).
521. Luyen, B. T. T. *et al.* The Anti-Osteoporosis and Antioxidant Activities of Chemical Constituents from *Chrysanthemum indicum* Flowers. *Phyther. Res.* 29, 540–548 (2015).
522. Sang, S. *et al.* Antioxidative phenolic compounds isolated from almond skins (*Prunus amygdalus* Batsch). *J. Agric. Food Chem.* 50, 2459–2463 (2002).
523. Luyen, B. T. T. *et al.* Anti-inflammatory components of *Chrysanthemum indicum* flowers. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 25, 266–269 (2015).
524. Yeskaliyeva, B. *et al.* Bioactive flavonoids and saponins from *Climacoptera obtusifolia*. *Phytochemistry* 67, 2392–2397 (2006).
525. Liu, H. *et al.* Flavonoids from *halostachys caspica* and their antimicrobial and antioxidant activities. *Molecules* 15, 7933–7945 (2010).
526. Graef, C. F. F., Albuquerque, S. & Lopes, J. L. C. Chemical constituents of *Lychnophora pohlii* and trypanocidal activity of crude plant extracts and of isolated compounds. *Fitoterapia* 76, 73–82 (2005).
527. Ishida, H., Umino, T. & Tsuji, K. Studies on the antihemorrhagic substances in herbs classified as hemostatics in chinese medicine IX On the Antihemorrhagic Principles in *Typha lactifolia* L. *Chem Pharm Bull.* 36, 4414–4420 (1988).
528. Rao, Y. K., Geethangili, M., Fang, S. H. & Tzeng, Y. M. Antioxidant and cytotoxic activities of naturally occurring phenolic and related compounds: A comparative study. *Food Chem. Toxicol.* 45, 1770–1776 (2007).
529. Song, S. *et al.* 3-Hydroxymethylglutaryl Flavonol Glycosides from a Mongolian and Tibetan

- Medicine, *Oxytropis racemosa*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 58, 1587–1590 (2010).
530. Yesilada, E., Gürbüz, I. & Toker, G. Anti-ulcerogenic activity and isolation of the active principles from *Sambucus ebulus* L. leaves. *J. Ethnopharmacol.* 153, 478–483 (2014).
 531. Ee, Y. S. L., Ee, S. L., Ee, S. L., Im, B. K. & Huchi, K. O. Inhibitory Effects of Isorhamnetin-3- O - b - D - glucoside from *Salicornia herbacea* on Rat Lens Aldose Reductase and Sorbitol Accumulation in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Tissues. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 916–918 (2005).
 532. Ding, Y. *et al.* Chemical constituents from *Acer mandshuricum* and their effects on the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Bull. Korean Chem. Soc.* 31, 929–933 (2010).
 533. Suzy, A. E.-S., Souzan, M. I. M., Abdel-Rahim, S. I., Kamilia, A. E. S. & Farid, A. B. Anti-oxidant and cytotoxic activity of *Cassia nodosa* Buch.-Ham. ex Roxb. and some of its pure constituents. *African J. Pharm. Pharmacol.* 8, 586–597 (2014).
 534. Nithianantham, K. *et al.* Evaluation of hepatoprotective effect of methanolic extract of *Clitoria ternatea* (Linn.) flower against acetaminophen-induced liver damage. *Asian Pacific J. Trop. Dis.* 3, 314–319 (2013).
 535. Magnot, S., Cicala, C., *et al.* The flavonoids of *Allium ursinum*. *Phytochemistry* 41, 531-536 (1996).
 536. Zanatta, L. *et al.* Insulinomimetic effect of kaempferol 3-neohesperidoside on the rat soleus muscle. *J. Nat. Prod.* 71, 532–535 (2008).
 537. Ramadan, M. A., Ahmad, A. S., Nafady, A. M. & Mansour, A. I. Chemical composition of the stem bark and leaves of *Ficus pandurata* Hance. *Nat. Prod. Res.* 23, 1218–1230 (2009).
 538. Kim, S. S. *et al.* Down-regulation of tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and MITF expressions by citrus press-cakes in murine B16 F10 melanoma. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 3, 617–622 (2013).
 539. Cazarolli, L. H., Folador, P., Pizzolatti, M. G. & Mena Barreto Silva, F. R. Signaling pathways of kaempferol-3-neohesperidoside in glycogen synthesis in rat soleus muscle. *Biochimie* 91, 843–849 (2009).
 540. Yamasaki, K., Hishiki, R., Kato, E. & Kawabata, J. Study of kaempferol glycoside as an insulin mimic reveals glycon to be the key active structure. *ACS Med. Chem. Lett.* 2, 17–21 (2011).
 541. Rivière, C. *et al.* Polyphenols isolated from antiradical extracts of *Mallotus metcalfeanus*. *Phytochemistry* 70, 91–99 (2009).
 542. Gamez, E. J. C. *et al.* Antioxidant flavonoid glycosides from *Daphniphyllum calycinum*. *J. Nat. Prod.* 61, 706–708 (1998).
 543. Kazuma, K., Noda, N. & Suzuki, M. Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*. *Phytochemistry* 62, 229–237 (2003).
 544. M'rabet, Y. *et al.* Profiling of phenolic compounds and antioxidant activity of *Melia azedarach* L. leaves and fruits at two stages of maturity. *Ind. Crops Prod.* 107, 232–243 (2017).
 545. Zhou, X., Peng, J., Fan, G. & Wu, Y. Isolation and purification of flavonoid glycosides from *Trollius ledebouri* using high-speed counter-current chromatography by stepwise increasing the flow-rate of the mobile phase. *J. Chromatogr. A* 1092, 216–221 (2005).
 546. Jang, G. H. *et al.* Characterization and quantification of flavonoid glycosides in the *Prunus* genus by UPLC-DAD-QTOF/MS. *Saudi J. Biol. Sci.* (2016). doi:10.1016/j.sjbs.2016.08.001
 547. Ferreres, F. *et al.* First report of non-coloured flavonoids in *Echium plantagineum* bee pollen: differentiation of isomers by liquid chromatography/ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun.*

- Mass Spectrom.* 24, 801-806 (2010).
548. Maietti, A. *et al.* Metabolite profiling of flavonols and in vitro antioxidant activity of young shoots of wild *Humulus lupulus* L. (hop). *J. Pharm. Biomed. Anal.* 142, 28–34 (2017).
549. Yayli, N. & Urk, E. N. T. Flavonol Glycosides from. 24, 191–197 (2000).
550. Sasaki, K. & Takahashi, T. A flavonoid from *Brassica rapa* flower as the UV-absorbing nectar guide. *Phytochemistry* 61, 339–343 (2002).
551. Yokozawa, T., Kim, H. Y., Cho, E. J., Choi, J. S. & Chung, H. Y. Antioxidant effects of isorhamnetin 3,7-di-O- β -D-glucopyranoside isolated from mustard leaf (*Brassica juncea*) in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J. Agric. Food Chem.* 50, 5490–5495 (2002).
552. Igarashi, K., Mikami, T., Takahashi, Y. & Sato, H. Comparison of the preventive activity of isorhamnetin glycosides from atsumi-kabu (red turnip, *Brassica campestris* L.) leaves on carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 856–60 (2008).
553. Dong, Y. *et al.* Antioxidant phenolic compounds from the stems of *Entada phaseoloides*. *Chem. Biodivers.* 9, 68–79 (2012).
554. Oh, S. M. & Chung, K. H. Antiestrogenic activities of *Ginkgo biloba* extracts. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 100, 167–176 (2006).
555. Suleimenov, E. M. Components of *Peucedanum morisonii* and their antimicrobial and cytotoxic activity. *Chem. Nat. Compd.* 45, 710–711 (2009).
556. Chen, J. H. *et al.* Comparison of Antioxidant Capability after Isopropanol Salting-Out Pretreatment and n-Butanol Partition Extraction, and Identification and Evaluation of Antioxidants of *Sedum formosanum* N.E.Br. *Molecules* 21, (2016).
557. Mekky, R. H. *et al.* Profiling of phenolic and other compounds from Egyptian cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and antioxidant activity: A comparative study. *RSC Adv.* 5, 17751–17767 (2015).
558. Oszmiański, J., Kolniak-Ostek, J. & Wojdyło, A. Characterization and content of flavonol derivatives of *Allium ursinum* L. plant. *J. Agric. Food Chem.* 61, 176–184 (2013).
559. Marín, C. *et al.* In vitro and in vivo trypanocidal activity of flavonoids from *Delphinium staphisagria* against chagas disease. *J. Nat. Prod.* 74, 744–750 (2011).
560. Pedras, M. S. C., Zheng, Q. A., Gadagi, R. S. & Rimmer, S. R. Phytoalexins and polar metabolites from the oilseeds canola and rapeseed: Differential metabolic responses to the biotroph *Albugo candida* and to abiotic stress. *Phytochemistry* 69, 894–910 (2008).
561. Li, C. Y., Lee, E. J. & Wu, T. S. Antityrosinase Principles and Constituents of the Petals of *Crocus sativus*. *J. Nat. Prod.* 67, 437–440 (2004).
562. Kolomiets, N. E., Yusubov, M. S. & Kalinkina, G. I. Flavonoid composition of *Equisetum arvense* and *E. x litorale* studied by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Chem. Nat. Compd.* 48, 135–136 (2012).
563. Wu, T.-S., Leu, Y.-L. & Chan, Y.-Y. Constituents of the fresh leaves of *Aristolochia cucurbitifolia*. *Chem Pharm Bull* 47, 571–573 (1999).
564. Zhang, H. *et al.* Antioxidant activities and chemical constituents of flavonoids from the flower of *Paeonia ostii*. *Molecules* 22, (2017).
565. Tai, B. H. *et al.* A new flavan-3-ol and the anti-inflammatory effect of flavonoids from the fruit peels of *Wisteria floribunda*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 13, 1061–1068 (2011).

566. Morikawa, T. *et al.* Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity of dimeric dihydrochalcone glycosides from flowers of *Helichrysum arenarium*. *J. Nat. Med.* 69, 494–506 (2015).
567. Yamauchi, K., Mitsunaga, T. & Batubara, I. Synthesis of quercetin glycosides and their melanogenesis stimulatory activity in B16 melanoma cells. *Bioorganic Med. Chem.* 22, 937–944 (2014).
568. Li, W., Lee, C., Kim, Y. H., Ma, J. Y. & Shim, S. H. Chemical constituents of the aerial part of *Taraxacum mongolicum* and their chemotaxonomic significance. *Nat. Prod. Res.* 31, 2303–2307 (2017).
569. Anil, S., Dosler, S. & Mericli, A. H. Chemical composition and antimicrobial activity of *Verbascum caesareum*. *Chem. Nat. Compd.* 52, 125–126 (2016).
570. Xu, J. F. *et al.* Flavonol glycosides and monoterpenoids from *Potentilla anserina*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 12, 529–534 (2010).
571. Ibrahim, L. F. *et al.* Flavonoid constituents and biological screening of *Astragalus bombycinus*. *Nat. Prod. Res.* 37–41 (2012).
572. Sindambiwe, J. B. *et al.* Triterpenoid saponins from *Maesa lanceolata*. *Phytochemistry* 41, 269–277 (1996).
573. Zhao, Y., Dou, J., Wu, T. & Aisa, H. A. Investigating the antioxidant and acetylcholinesterase inhibition activities of *Gossypium herbaceum*. *Molecules* 18, 951–962 (2013).
574. Bae, K. *et al.* A new flavonoid glycoside from the leaf of *Cephalotaxus koreana*. *Fitoterapia* 78, 409–413 (2007).
575. Li, Y. L. *et al.* Phenolic compounds of *Abies nephrolepis* and their no production inhibitory activities. *Chem. Biodivers.* 8, 2299–2309 (2011).
576. Matsuda, H., Morikawa, T., Toguchida, I., Harima, S. & Yoshikawa, M. Medicinal flowers. VI. Absolute stereostructures of two new flavanone glycosides and a phenylbutanoid glycoside from the flowers of *Chrysanthemum indicum* L.: their inhibitory activities for rat lens aldose reductase. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 50, 972–975 (2002).
577. Kim, S. Y., Gao, J. J. & Kang, H. K. Two flavonoids from the leaves of *Morus alba* induce differentiation of the human promyelocytic leukemia (HL-60) cell line. *Biol. Pharm. Bull.* 23, 451–455 (2000).
578. He, Z. *et al.* Isolation, structural characterization and neuraminidase inhibitory activities of polyphenolic constituents from *Flos caryophylli*. *Phytochem. Lett.* 19, 160–167 (2017).
579. Qiu, H. *et al.* Capture of anti-coagulant active ingredients from Moutan Cortex by platelet immobilized chromatography and evaluation of anticoagulant activity in rats. *Biomed. Pharmacother.* 95, 235–244 (2017).
580. Lee, S.-H., Park, J. S., Kim, S. Y., Kim, J. J. & Chung, S. R. Isolation of Inhibitory Components on Tyrosinase Activity from the Bark of *Paeonia moutan*. 42, 353–358 (1998).
581. Panusa, A., Petrucci, R., Marrosu, G., Multari, G. & Gallo, F. R. UHPLC-PDA-ESI-TOF/MS metabolic profiling of *Arctostaphylos pungens* and *Arctostaphylos uva-ursi*. A comparative study of phenolic compounds from leaf methanolic extracts. *Phytochemistry* 115, 79–88 (2015).
582. Santos, S. A. O., Vilela, C., Freire, C. S. R., Neto, C. P. & Silvestre, A. J. D. Ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry applied to the identification of valuable phenolic compounds from eucalyptus wood. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 938, 65–74 (2013).

583. Graça, V. C. *et al.* Bio-guided fractionation of extracts of *Geranium robertianum* L.: Relationship between phenolic profile and biological activity. *Ind. Crops Prod.* 108, 543–552 (2017).
584. Regueiro, J. *et al.* Comprehensive identification of walnut polyphenols by liquid chromatography coupled to linear ion trap-Orbitrap mass spectrometry. *Food Chem.* 152, 340–348 (2014).
585. Fernández-Ponce, M. T., Casas, L., Mantell, C. & De La Ossa, E. M. Use of high pressure techniques to produce *Mangifera indica* L. leaf extracts enriched in potent antioxidant phenolic compounds. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 29, 94–106 (2015).
586. Hu, K., Dars, A. G., Liu, Q., Xie, B. & Sun, Z. Phytochemical profiling of the ripening of Chinese mango (*Mangifera indica* L.) cultivars by real-time monitoring using UPLC-ESI-QTOF-MS and its potential benefits as prebiotic ingredients. *Food Chem.* 256, 171–180 (2018).
587. Fernández-Ponce, M. T. *et al.* Selective antitumoural action of pressurized mango leaf extracts against minimally and highly invasive breast cancer. *Food Funct.* 8, 3610–3620 (2017).
588. Al-Sayed, E. & Esmat, A. Hepatoprotective and antioxidant effect of ellagitannins and galloyl esters isolated from *Melaleuca styphelioides* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in HepG2 cells. *Pharm. Biol.* 54, 1727–1735 (2016).
589. Mansour, A. *et al.* A new cineol derivative, polyphenols and norterpenoids from Saharan myrtle tea (*Myrtus nivellei*): Isolation, structure determination, quantitative determination and antioxidant activity. *Fitoterapia* 119, 32–39 (2017).
590. Díaz-De-Cerio, E. *et al.* Establishment of pressurized-liquid extraction by response surface methodology approach coupled to HPLC-DAD-TOF-MS for the determination of phenolic compounds of myrtle leaves. *Anal. Bioanal. Chem.* 410, 3547–3557 (2018).
591. Ieri, F., Innocenti, M., Possieri, L., Gallori, S. & Mulinacci, N. Phenolic composition of ‘bud extracts’ of *Ribes nigrum* L., *Rosa canina* L. and *Tilia tomentosa* M. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 115, 1–9 (2015).
592. Bhakta, H. K. *et al.* Potential anti-cholinesterase and β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 inhibitory activities of cornuside and gallotannins from *Cornus officinalis* fruits. *Arch. Pharm. Res.* 40, 836–853 (2017).
593. Xiang, Y. F. *et al.* Effects of 1,2,4,6-tetra-O-galloyl- β -D-glucose from *P. emblica* on HBsAg and HBeAg secretion in HepG2.2.15 cell culture. *Virolog. Sin.* 25, 375–380 (2010).
594. Huang, J., Xu, X., Xie, C., Xie, Z. & Yang, M. Isolation and purification of paeoniflorin and albiflorin from radix paeoniae rubra by high speed counter-current chromatography. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 36;419-427, (2013).
595. Pir, M., Ahmad, S., Rubnawaz, H., Ullah, N. & Malik, A. New monoterpene glycosides from *Paeonia lactiflora*.pdf. 8, 8–12 (2015).
596. Choudhary, M. I. *et al.* Phenolic and other constituents of fresh water fern *Salvinia molesta*. *Phytochemistry* 69, 1018–1023 (2008).
597. Huyen, C. T. T. *et al.* Chemical Constituents from *Cimicifuga dahurica* and Their Anti-Proliferative Effects on MCF-7 Breast Cancer Cells. *Molecules* 23, (2018).
598. Zhou, J., Xie, G. & Yan, X. *Encyclopedia of Traditional Chinese Medicines Vol.6.* (Heidelberg, 2011).
599. Chen, D.-M., Xiao, L., Cai, X., Zeng, R. & Zhu, X.-Z. Involvement of multitargets in paeoniflorin-induced preconditioning. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319, 165–180 (2006).
600. Shi, Y. H. *et al.* Monoterpene derivatives with anti-allergic activity from red peony root, the root of

- Paeonia lactiflora*. *Fitoterapia* 108, 55–61 (2016).
601. Jin, Z. L. *et al.* Receptor and transporter binding and activity profiles of albiflorin extracted from *Radix paeoniae Alba*. *Sci. Rep.* 6, 1–11 (2016).
 602. Ho, S.-L. *et al.* Inhibition of β -amyloid aggregation by albiflorin, aloemodin and neohesperidin and their neuroprotective effect on primary hippocampal cells against β -amyloid induced toxicity. *Curr. Alzheimer Res.* 12, 424–433 (2015).
 603. Chen, Y. H. *et al.* New benzoyl glucosides and cytotoxic pterisin sesquiterpenes from *Pteris ensiformis* Burm. *Molecules* 13, 255–266 (2008).
 604. Hayashi, T. *et al.* Paeonilactone-A, -B, and -C, new monoterpenoids from paeony root. *Tetrahedron Lett.* 26, 3699–3702 (1985).
 605. Medical, T. & Medical, T. Biotransformation of Pinoresinol Diglucoside to Mammalian Lignans by Human Intestinal Microflora, and Isolation of *Enterococcus faecalis* Strain PDG-1 Responsible for the Transformation of (+)-Pinoresinol to (+)-Lariciresinol *Chem Pharm Bull* 51, 508–515 (2003).
 606. Liu, X. *et al.* Lignans from the root of *Paeonia lactiflora* and their anti- β -amyloid aggregation activities. *Fitoterapia* 103, 136–142 (2015).
 607. Suh, W. S., Subedi, L., Kim, S. Y., Choi, S. U. & Lee, K. R. Bioactive lignan constituents from the twigs of *Sambucus williamsii*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2016). doi:10.1016/j.bmcl.2016.03.023
 608. Ma, Z. *et al.* Lariciresinol induces apoptosis in HepG2 cells via mitochondrial-mediated apoptosis pathway. *European Journal of Pharmacology* (2017). doi:10.1016/j.ejphar.2017.12.027
 609. Rajachan, O., Kanokmedhakul, S. & Nasomjai, P. Chemical constituents and biological activities from roots of *Enkleia siamensis*. *Natural Product Research* 28;268–270 doi:10.1080/14786419.2013.838241
 610. Kaneda, M., Iitaka, Y., Shibata, S. Chemical studies on the oriental plant drugs-XXXIII. The absolute structures of paeoniflorin, albiflorin, oxypaeoniflorin and benzoylpaeoniflorin isolated from chinese paeony root. *Tetrahedron* 28, 4309–4317 (1972).
 611. Krajewska, U. & Olszewska, M. A. Rare Ellagic Acid Sulphate Derivatives from the Rhizome of *Geum rivale* L. — Structure, Cytotoxicity, and Validated HPLC-PDA Assay. *Appl. Sci.* (2017). doi:10.3390/app7040400
 612. Orhan, I., Kartal, M., Tosun, F. & Şener, B. Screening of various phenolic acids and flavonoid derivatives for their anticholinesterase potential. *Zeitschrift für Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 62, 829–832 (2007).
 613. Kim, S. H. *et al.* Chemical constituents isolated from *Paeonia lactiflora* roots and their neuroprotective activity against oxidative stress in vitro. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 24, 1138–1140 (2009).
 614. Abdel-hafez, A. A., Meselhy, M. R., Hattori, M. & Mahfouz, N. M. Effects of Paeoniflorin Derivatives on Scopolamine-Induced Amnesia Using a Passive Avoidance Task in Mice; Structure-Activity Relationship. (2014). doi:10.1248/bpb.21.1174
 615. Elufioye, T. O., Berida, T. I. & Habtemariam, S. Plants-Derived Neuroprotective Agents: Cutting the Cycle of Cell Death through Multiple Mechanisms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* (2017).
 616. Balkis, A., Tran, K., Lee, Y. Z. & Ng, K. Screening Flavonoids for Inhibition of Acetylcholinesterase Identified Baicalein as the Most Potent Inhibitor. 7, 26–35 (2015).

617. Ademosun, A. O., Oboh, G., Bello, F. & Ayeni, P. O. Antioxidative Properties and Effect of Quercetin and Its Glycosylated Form (Rutin) on Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Activities. *J. Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 21, NP11–NP17 (2016).
618. Roseiro, L. B., Rauter, A. P. & Serralheiro, M. L. M. Polyphenols as acetylcholinesterase inhibitors: Structural specificity and impact on human disease. *Nutr. Aging* 1, 99–111 (2012).
619. Nugroho, A., Choi, J. S., Hong, J. P. & Park, H. J. Anti-acetylcholinesterase activity of the aglycones of phenolic glycosides isolated from *Leonurus japonicus*. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 7, 849–854 (2017).
620. Swanson, A. N. N. L., Wheeler, L. M. & Worrel, S. The effect of a series of flavonoids on hyaluronidase and some other related enzymes. *J Biol Chem* 183;739-747 (1949).
621. Kuppusamy, U. R. & Das, N. P. Structure-activity studies of flavonoids as inhibitors of hyaluronidase. *Biochem. Pharmacol.* 40, 397–401 (1989).
622. Kucukboyaci, N., Orhan, I. & Bilge, S. Assessment of Enzyme Inhibitory and Antioxidant Activities of Lignans from *Taxus baccata* L. *Z. Naturforsch* 65c; 187-194 (2010).

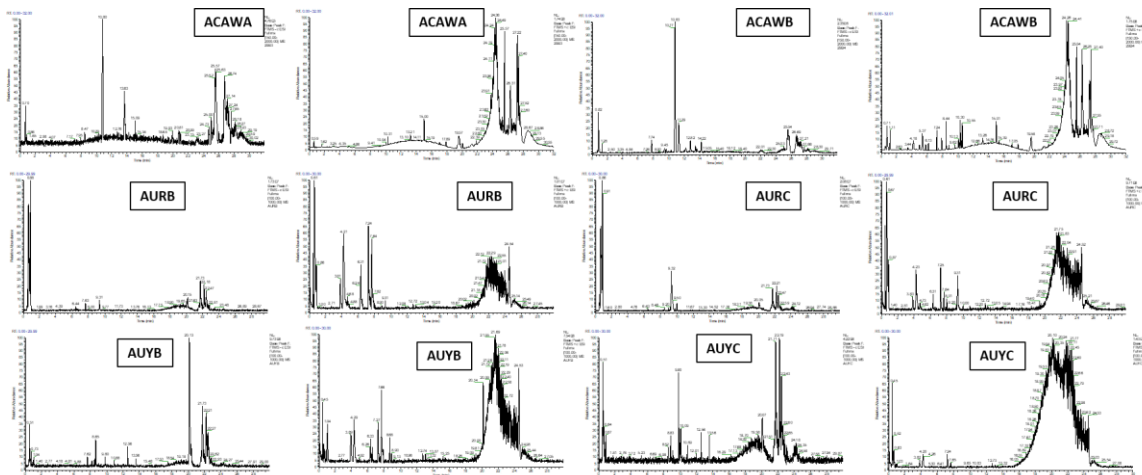
ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποτελεί μια προσπάθεια ολοκληρωμένης εθνοφαρμακολογικής μελέτης η οποία ξεκίνησε από την εύρεση της πηγής των πληροφοριών, κειμένων θεραπευτικής και την ταυτοποίηση των φυτικών ειδών που αναφέρονται, την συστηματική καταγραφή των θεραπευτικών ενδείξεων και των αναφορών. Ακολούθησε η συλλογή των πιο αντιπροσωπευτικών και ενδιαφέροντων φυτικών ειδών, η παρασκευή εκχυλισμάτων διαφορετικών ποικιλιών με σκοπό την παραλαβή πληθώρας συστατικών και η αρχική βιολογική αξιολόγηση και ο έλεγχος του χημικού φορτίου. Επτά από τα πιο σημαντικά εκχυλίσματα επιλέχθηκαν να μελετηθούν περαιτέρω με σκοπό την επαλήθευση ή διάψευση της αρχικής εθνοφαρμακολογικής πληροφορίας. Η ένταξη του στατιστικού εργαλείου HetCA στην εθνοφαρμακολογική έρευνα κρίνεται απαραίτητη καθώς επιτρέπει την ταχύτερη και σε μεγάλο βαθμό αξιόπιστη αξιολόγηση του περιεχομένου και της δράσης των δευτερογενών μεταβολιτών. Η οργανωμένη διαχείριση του μεγάλου όγκου πληροφορίας που συγκεντρώνεται πολλές φορές στα πλαίσια μελετών παραδοσιακής θεραπευτικής θεωρείται απαραίτητη προκειμένου να εξασφαλίζονται γρήγορα και ασφαλή αποτελέσματα. Συνεπώς στους μελλοντικούς στόχους ανήκουν τα παρακάτω:

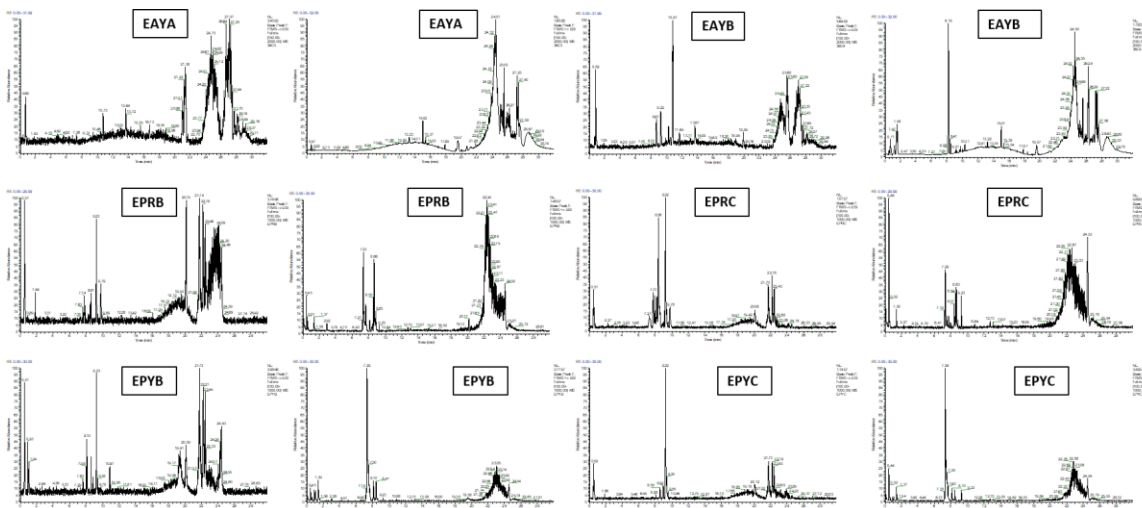
- Διεύρυνση της λίστας των υπό μελέτη φυτικών ειδών και εμπλουτισμός και με άλλες οικογένειες και κατ' επέκταση κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών
- Έλεγχοι των ήδη απομονωμένων μεταβολιτών ως προς την κυτταροτοξικότητα και ικανότητα αναστολής της φωσφολιπάσης
- Περαιτέρω φαρμακολογική αξιολόγηση των πιο δραστικών μορίων της παρούσας εργασίας
- Ταυτοποίηση και των υπολοίπων απομονωμένων καθαρών ουσιών
- Εφαρμογή της HetCA επεξεργασίας και σε άλλους βιολογικούς στόχους και φυτικά είδη έτσι ώστε να μπορέσει να καθιερωθεί ως τεχνική για τους σκοπούς της εθνοφαρμακολογίας

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

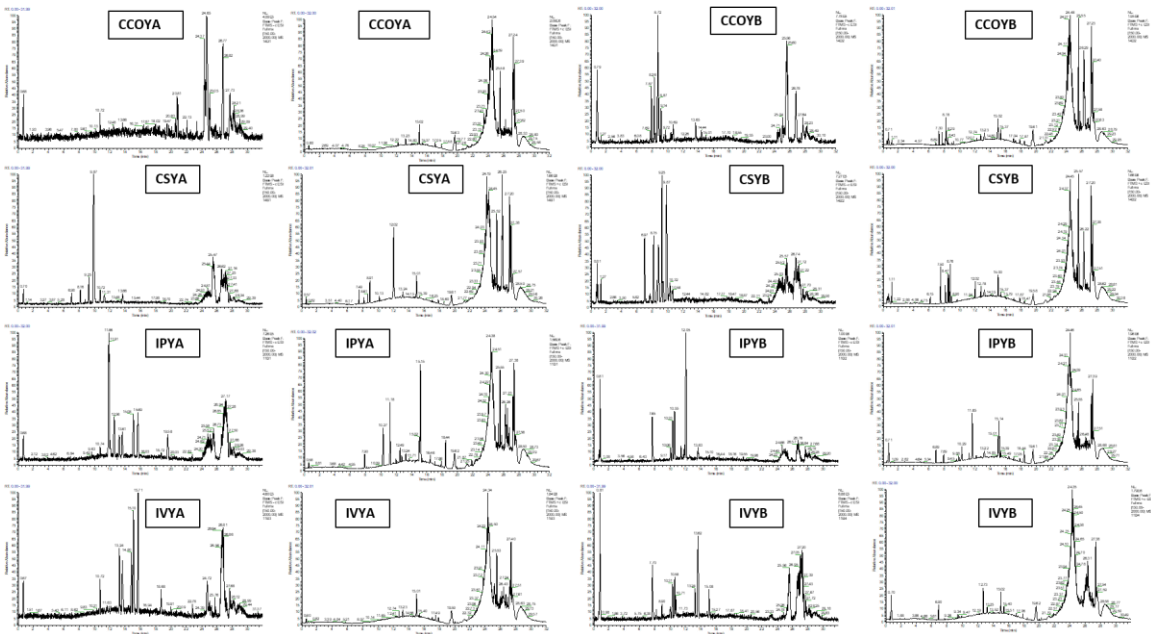
LC-MS PROFILING ΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ



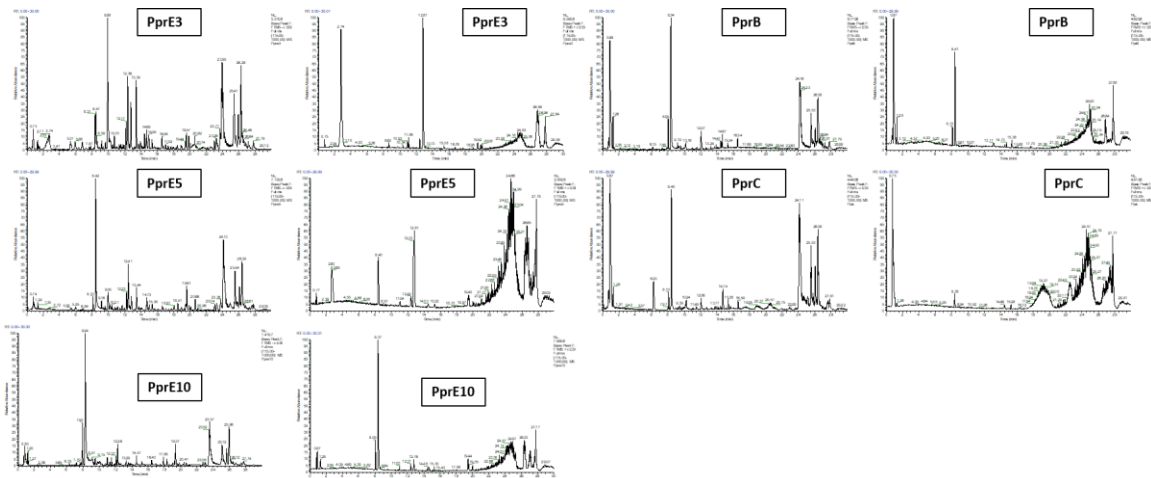
Εικόνα 211. LC-MS χρωματογραφήματα (TIC) σε θετικό και αρνητικό ιονισμό των εκχυλισμάτων του γένους *Anchusa* (ACAW(A,B): *Anchusa caespitosa* (EtOAc, MeOH), AUR(B,C): *Anchusa undulata* ssp. *hybrida* (ρίζες, MeOH, MeOH/H₂O), AUY(B,C): *Anchusa undulata* ssp. *hybrida* (υπέργεια, MeOH, MeOH/H₂O))



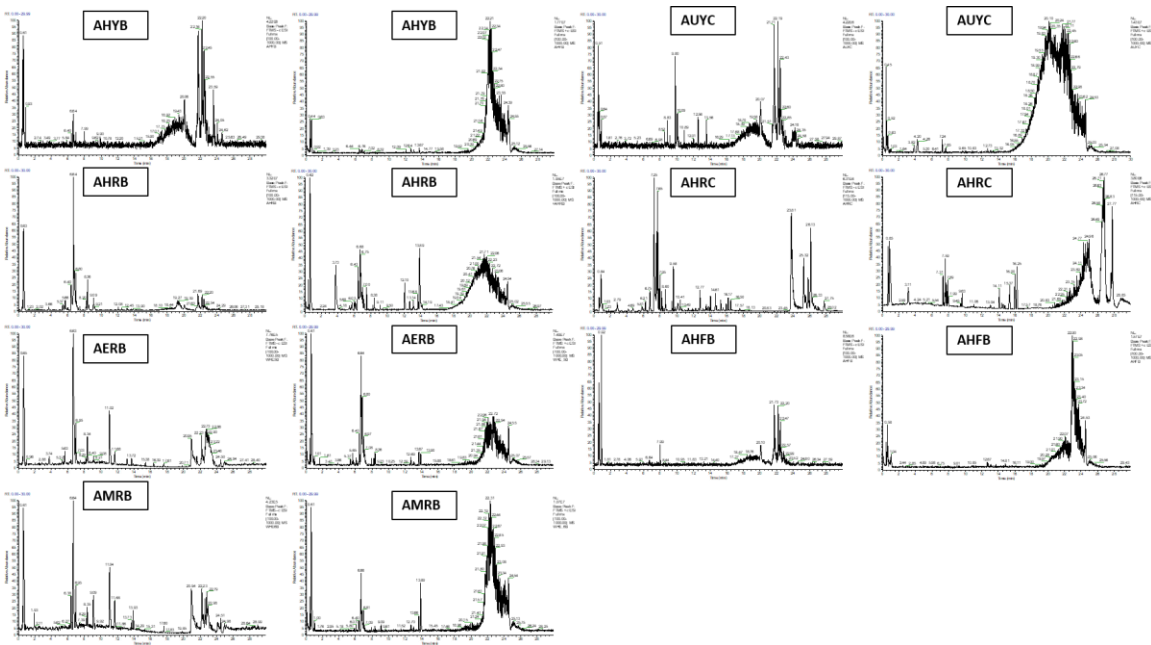
Εικόνα 212. LC-MS χρωματογραφήματα (TIC) σε θετικό και αρνητικό ιονισμό των εκχυλισμάτων του γένους *Echium* (EAY(A,B): *Echium angustifolium* (EtOAc, MeOH), EPR(B,C): *Echium plantagineum* (ρίζες, MeOH, MeOH/H₂O), EPY(B,C): *Echium plantagineum* (υπέργεια, MeOH, MeOH/H₂O))



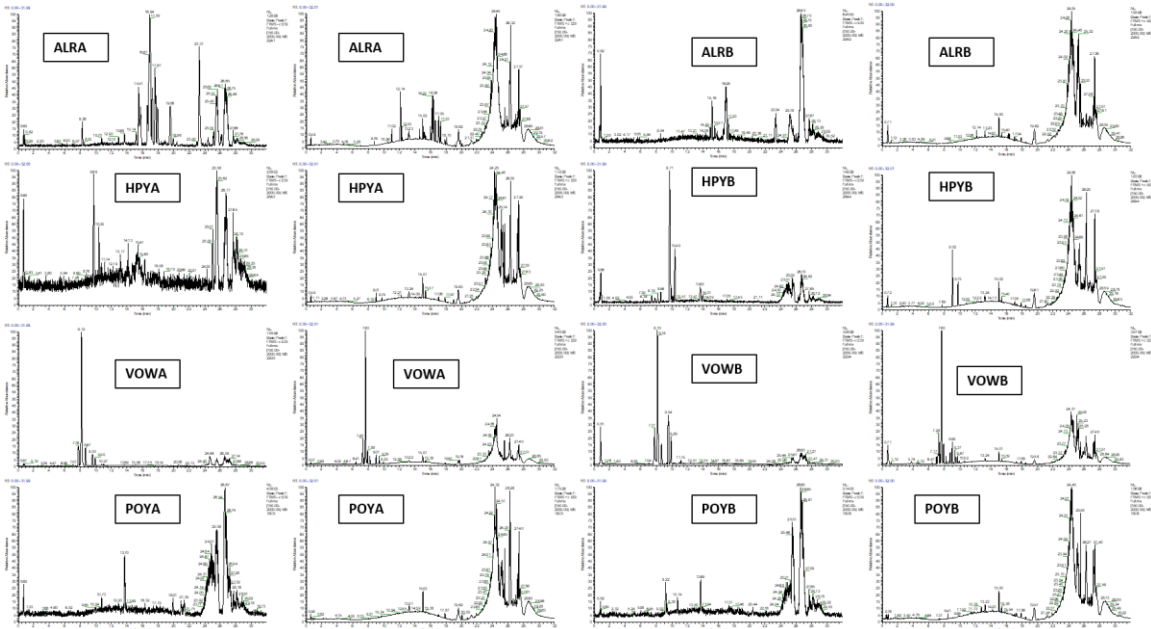
Εικόνα 213. LC-MS χρωματογραφήματα (TIC) σε θετικό και αρνητικό ιονισμό των εκχυλισμάτων της οικογένειας Compositae (CCOY(A,B): *Carlina corymbosa* (EtOAc, MeOH), CSY(A,B): *Chrysanthemum segetum* (EtOAc, MeOH), IPY(A,B): *Inula pseudolimonella* (EtOAc, MeOH), IVY(A,B): *Inula verbascifolia* ssp. *methanaea* (EtOAc, MeOH))



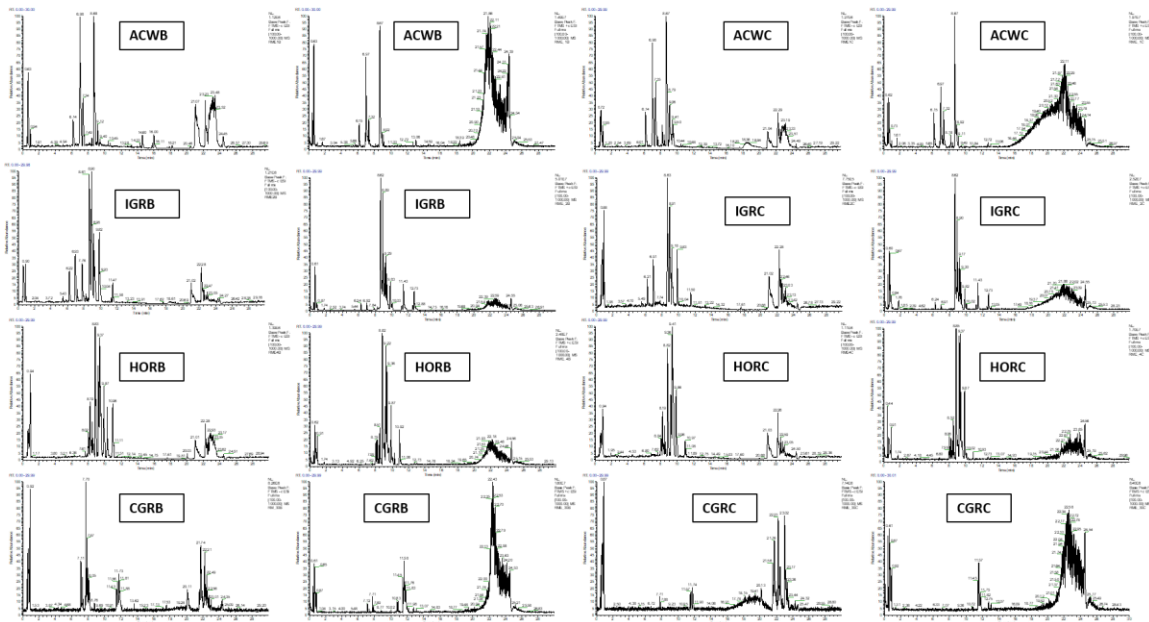
Εικόνα 214. LC-MS χρωματογραφήματα (TIC) σε θετικό και αρνητικό ιονισμό των εκχυλισμάτων της οικογένειας Paeoniaceae (PprE3: εκχύλισμα *Paeonia parnassica* ρίζες από SFE με 3% EtOH, PprE5: εκχύλισμα *Paeonia parnassica* ρίζες από SFE με 5% EtOH, PprE10: εκχύλισμα *Paeonia parnassica* ρίζες από SFE με 10% EtOH, Ppr(B, C): *Paeonia parnassica* (ρίζες, MeOH, MeOH/H₂O))



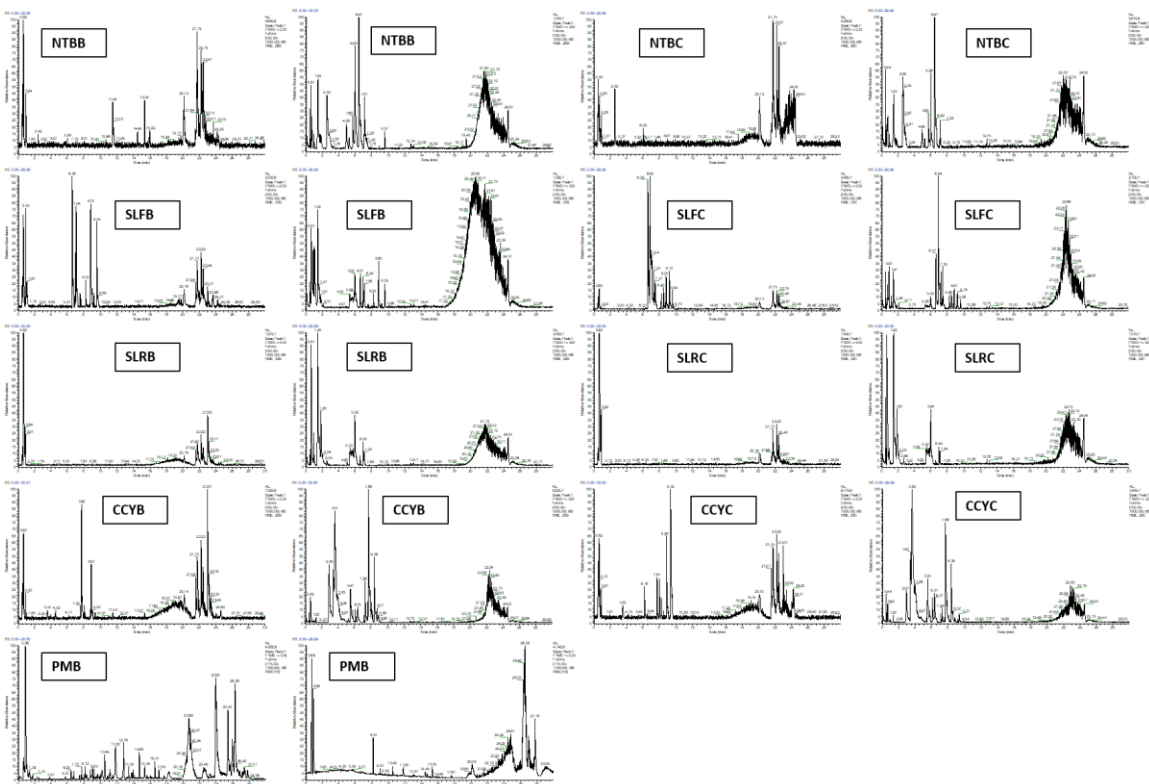
Εικόνα 215. LC-MS χρωματογραφήματα (TIC) σε θετικό και αρνητικό ιονισμό των εκχυλισμάτων της οικογένειας Aristolochiaceae (AHY (B,C): *Aristolochia hirta* (υπέργεια, MeOH, MeOH/H₂O), AHR (B,C): *Aristolochia hirta* (ρίζες, MeOH, MeOH/H₂O), AHFB: *Aristolochia hirta* (άνθη, MeOH), AERB: *Aristolochia elongata* (ρίζες, EtOH), AMRB: *Aristolochia microstoma* (ρίζες, EtOH))



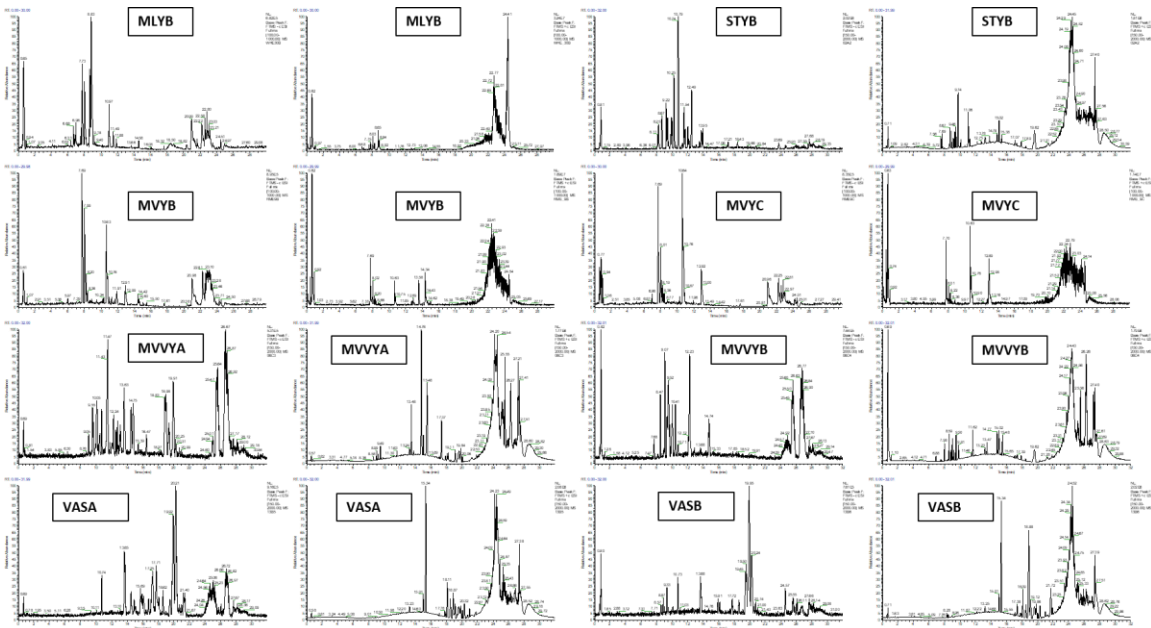
Εικόνα 216. LC-MS χρωματογραφήματα (TIC) σε θετικό και αρνητικό ιονισμό των εκχυλισμάτων ALR (A,B): *Asphodeline lutea* (EtOAc, MeOH), HPY(A,B): *Hypericum perforatum* (EtOAc, MeOH), VOW(A,B): *Verbena officinalis* (EtOAc, MeOH), POY(A,B): *Portulaca oleracea* (EtOAc, MeOH)



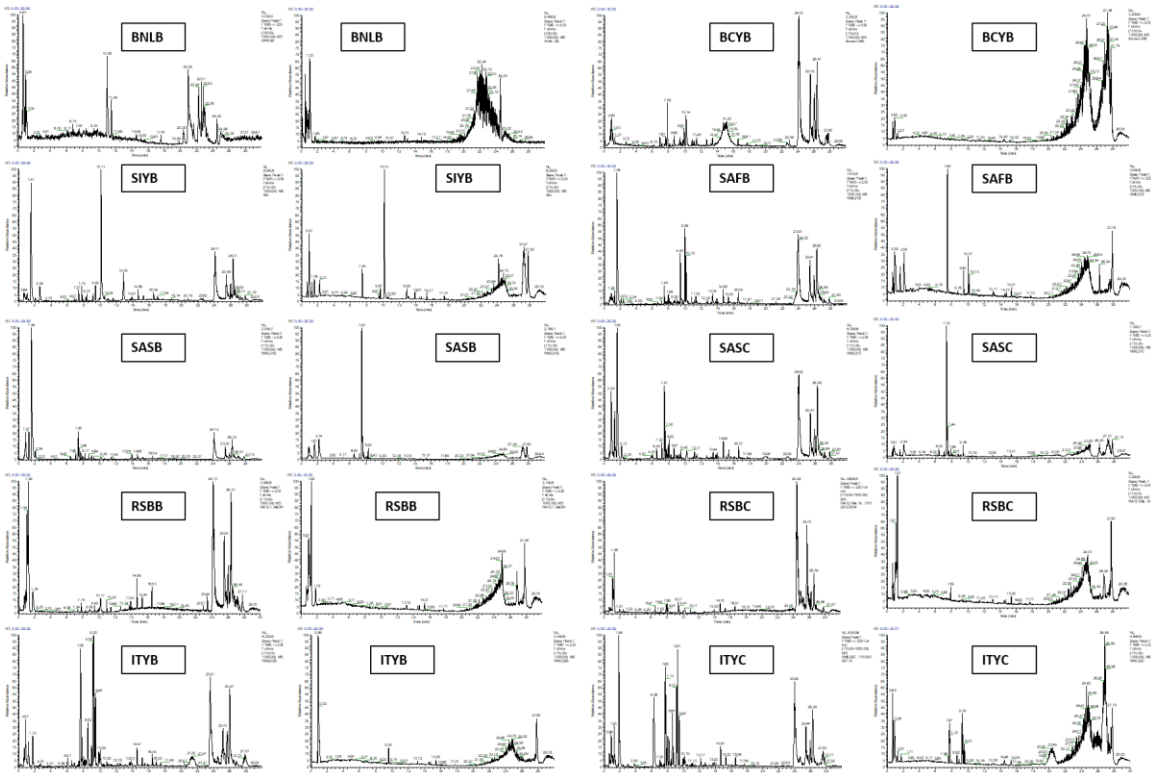
Εικόνα 217. LC-MS χρωματογραφήματα (TIC) σε θετικό και αρνητικό ιονισμό των εκχυλισμάτων ACW(B,C): *Adiantum capillus-veneris* (EtOH, EtOH/H₂O), IGR(B,C): *Iris germanica* (EtOH, EtOH/H₂O), HOR(B,C): *Helleborus odorus ssp. cyclophyllus* (EtOH, EtOH/H₂O), CGR(B,C): *Cyclamen graecum* (EtOH, EtOH/H₂O)



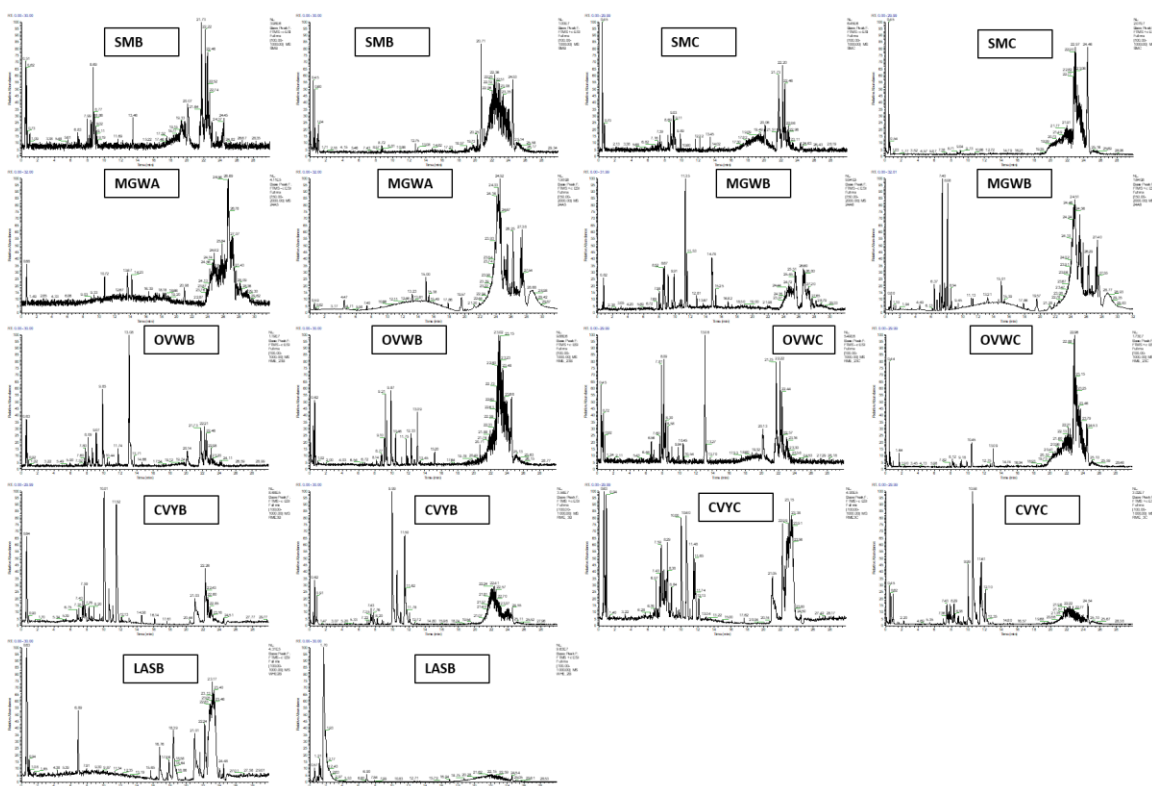
Εικόνα 218. LC-MS χρωματογραφήματα (TIC) σε θετικό και αρνητικό ιονισμό των εκχυλισμάτων NTB(B,C): *Narcissus tazetta* (EtOH, EtOH/H₂O), SLF(B,C): *Sternbergia lutea* (άνθη, EtOH, EtOH/H₂O), SLR(B,C): *Sternbergia lutea* (ρίζες, EtOH, EtOH/H₂O), CCY(B,C): *Cynoglossum creticum* (EtOH, EtOH/H₂O), PMB: *Plantago major* (EtOH)



Εικόνα 221. LC-MS χρωματογραφήματα (TIC) σε θετικό και αρνητικό ιονισμό των εκχυλισμάτων MLYB: *Mentha longifolia* (EtOH), STYB: *Satureja thymbra* (MeOH), MVY(B,C): *Marrubium vulgare* (EtOH, EtOH/H₂O), MVVY(A,B): *Marrubium velutinum* ssp. *velutinum* (EtOAc, MeOH), VAS(A,B): *Vitex agnus-castus* (EtOAc, MeOH)

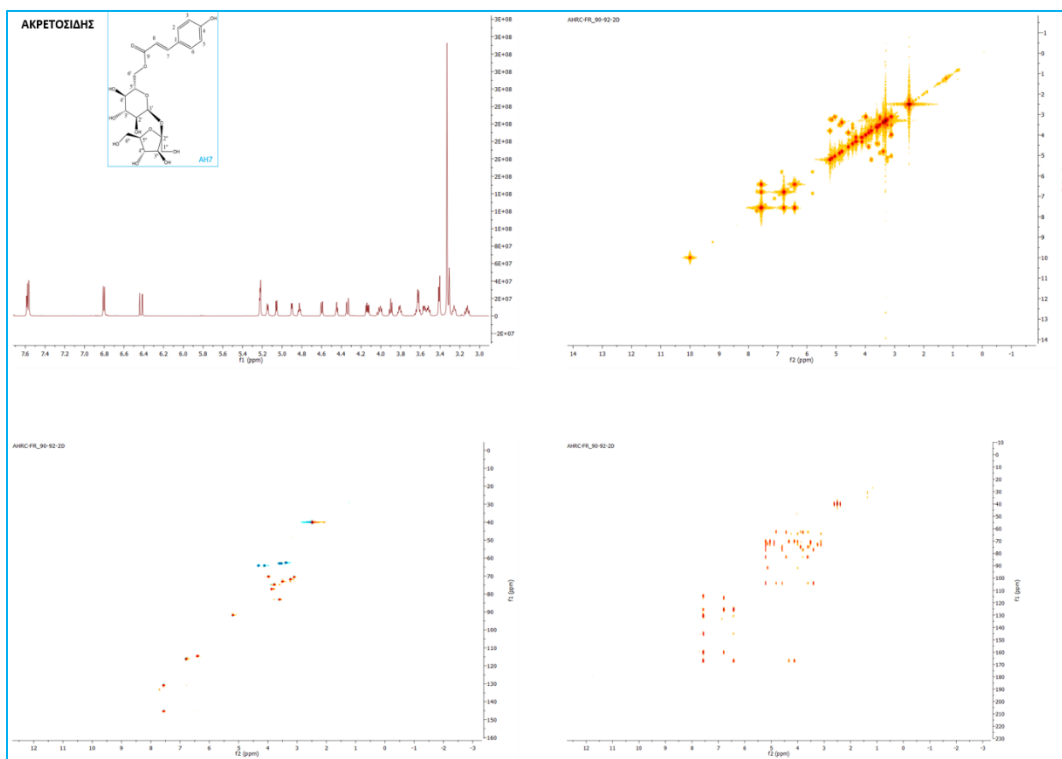


Εικόνα 222. LC-MS χρωματογραφήματα (TIC) σε θετικό και αρνητικό ιονισμό των εκχυλισμάτων της οικογένειας Brassicaceae (BNLB: *Brassica napus* (EtOH), BCYB: *Brassica cretica* (EtOH), SIYB: *Sisymbrium irio* (EtOH), SAFB: *Sinapis alba* (καρποί, EtOH), SAS(B,C): *Sinapis alba* (σπέρματα, EtOH, EtOH/H₂O), RSB(B,C): *Raphanus sativus* (MeOH, MeOH/H₂O), ITY(B,C): *Isatis tomentella* (EtOH, EtOH/H₂O))

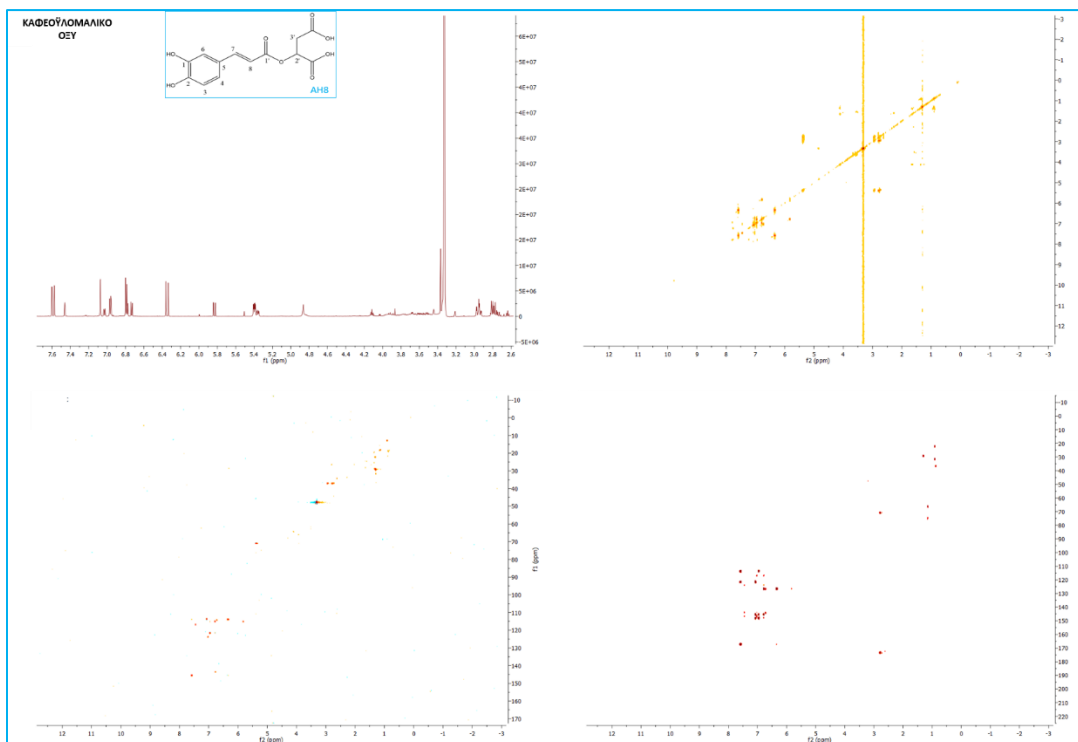


Εικόνα 223. LC-MS χρωματογραφήματα (TIC) σε θετικό και αρνητικό ιονισμό των εκχυλισμάτων της οικογένειας Leguminosae (SM (B,C): *Scorpiurus muricatus* (MeOH, MeOH/H₂O), MGW(A,B): *Melilotus graecus* (EtOAc, MeOH), OVW(B,C): *Ononis viscosa* (EtOH, EtOH/H₂O), CVY(B,C): *Calicotome villosa* (EtOH, EtOH/H₂O), LASB: *Lupinus albus* (EtOH))

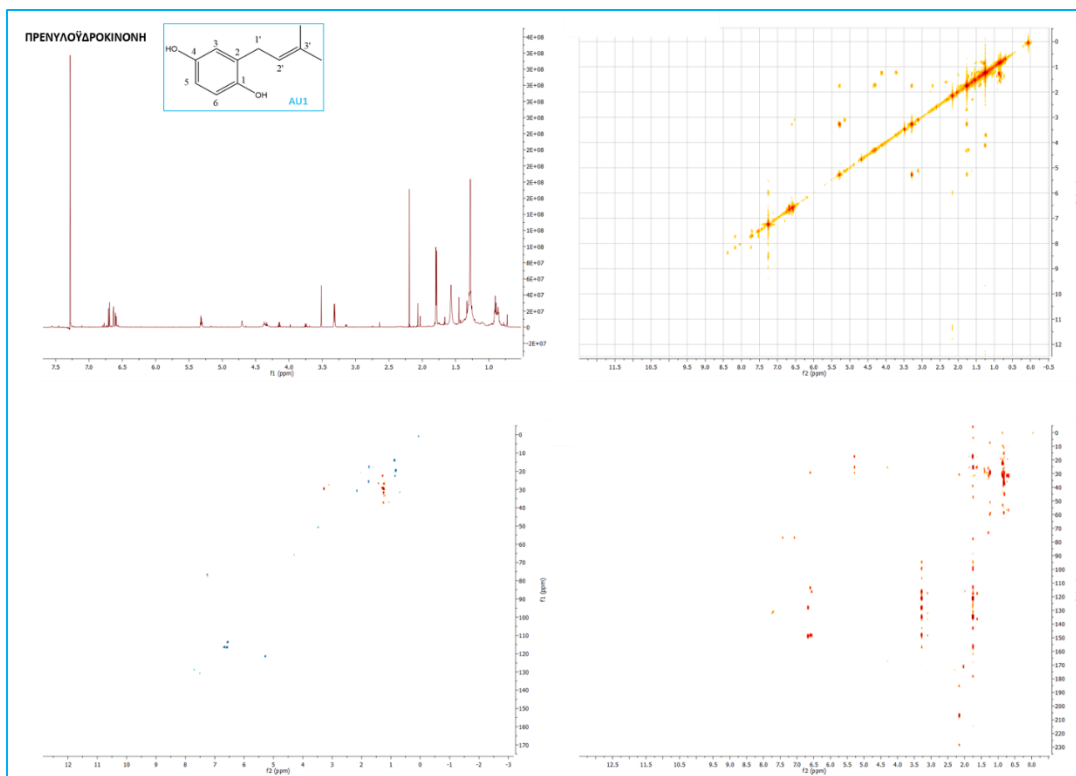
NMR ΦΑΣΜΑΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ



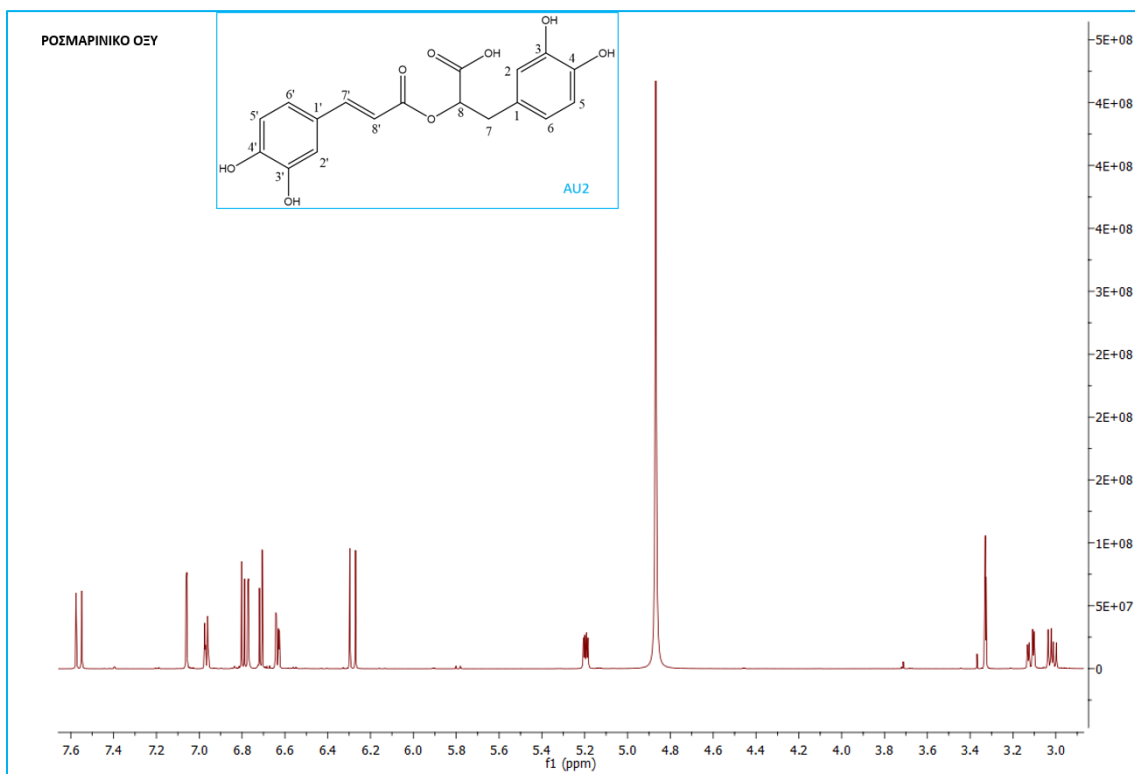
Εικόνα 224. NMR φάσματα ακρετοσίδη (MeOD)



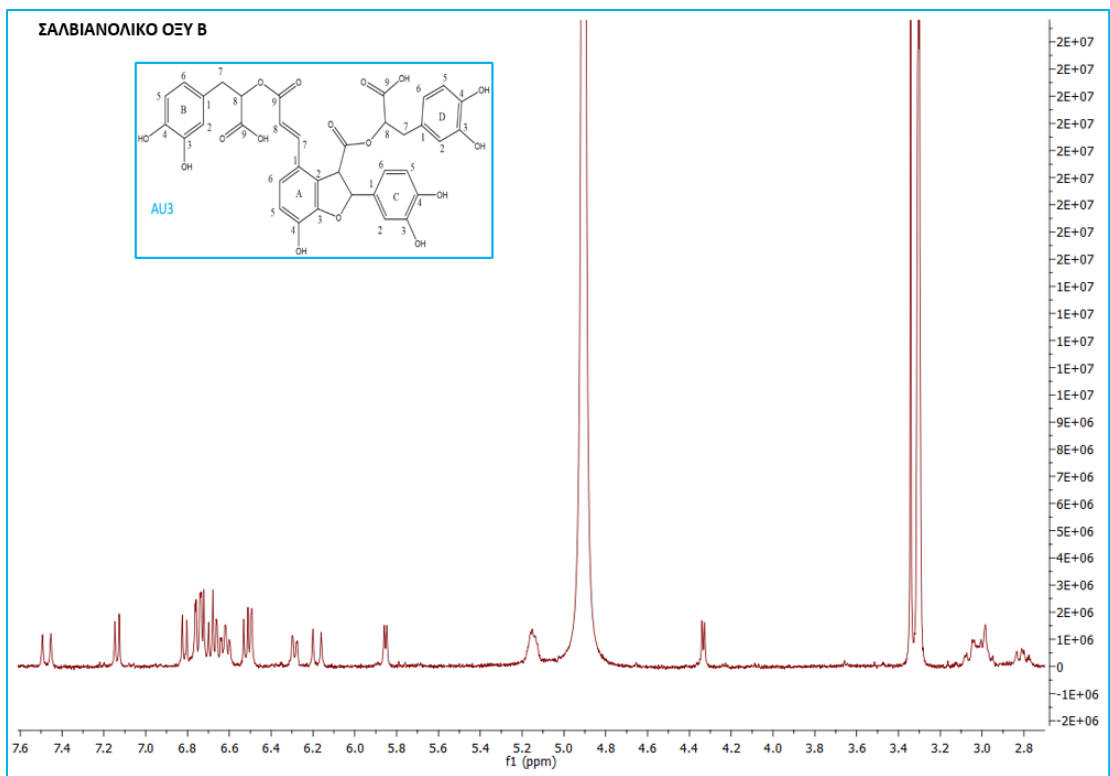
Εικόνα 225. NMR φάσματα καφεούλομαλικού οξέος (MeOD)



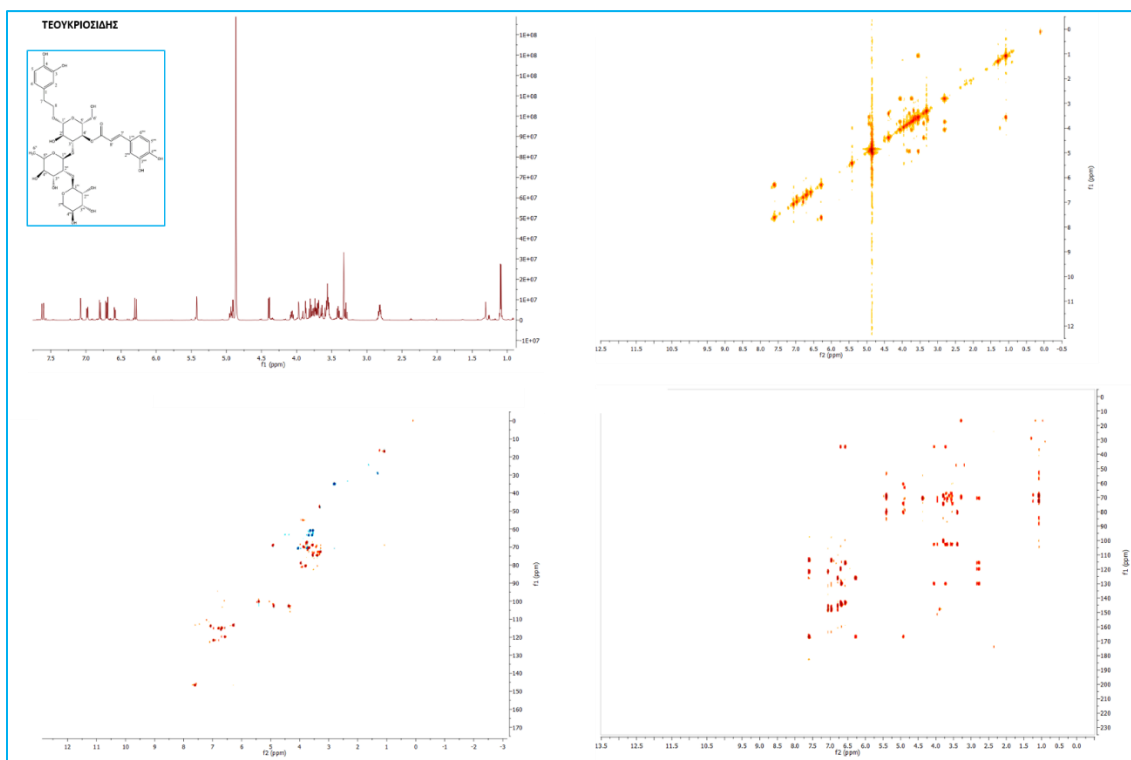
Εικόνα 226. NMR φάσματα πρενυλοΐδροκινόνης(CDCl₃)



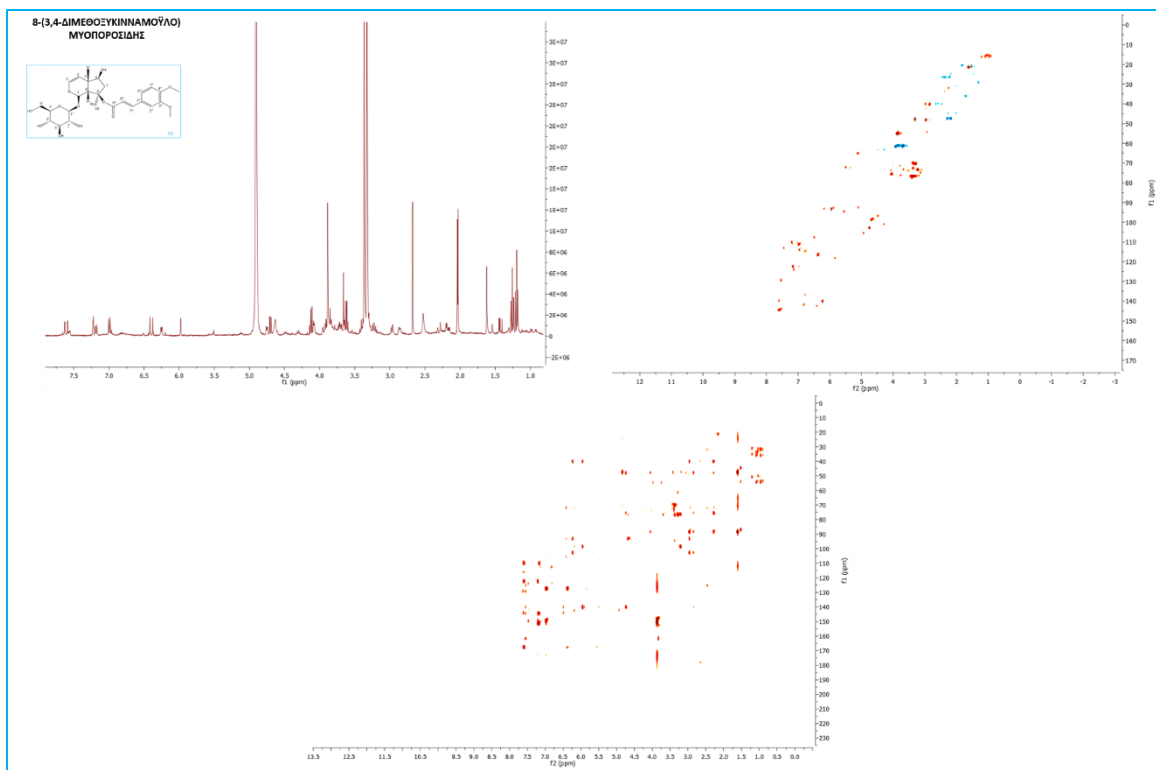
Εικόνα 227. ¹H-NMR φάσμα ροσμαρινικού οξέος (MeOD)



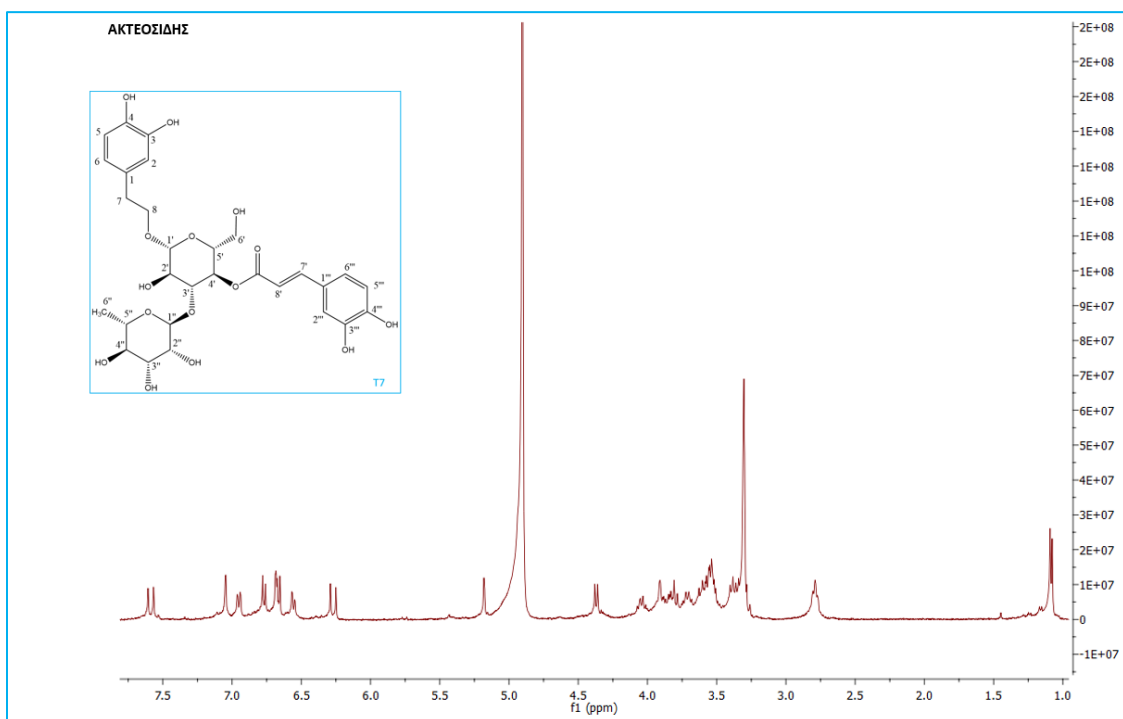
Εικόνα 228. $^1\text{H-NMR}$ φάσμα σαλβιανολικού οξέος Β (MeOD)



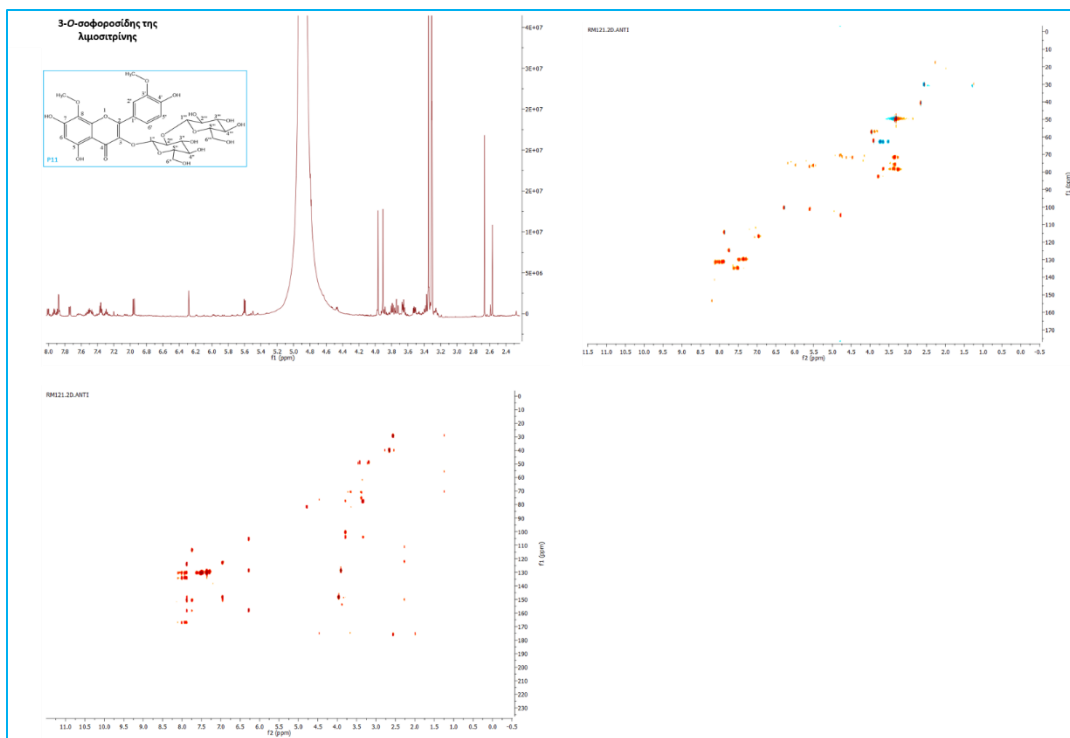
Εικόνα 229. Φάσματα NMR τεουκριοσίδη (MeOD)



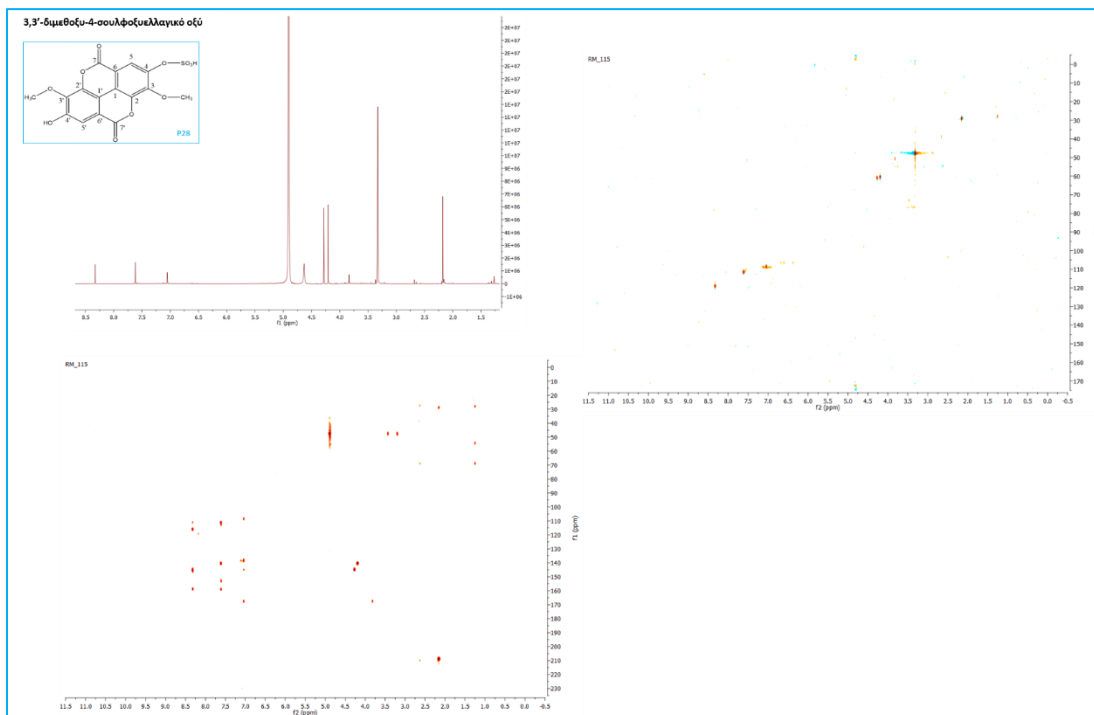
Εικόνα 230. Φάσματα NMR 8-O-(3,4-διμεθοξικιναμοΐλο)-μυοποροΐδης (MeOD)



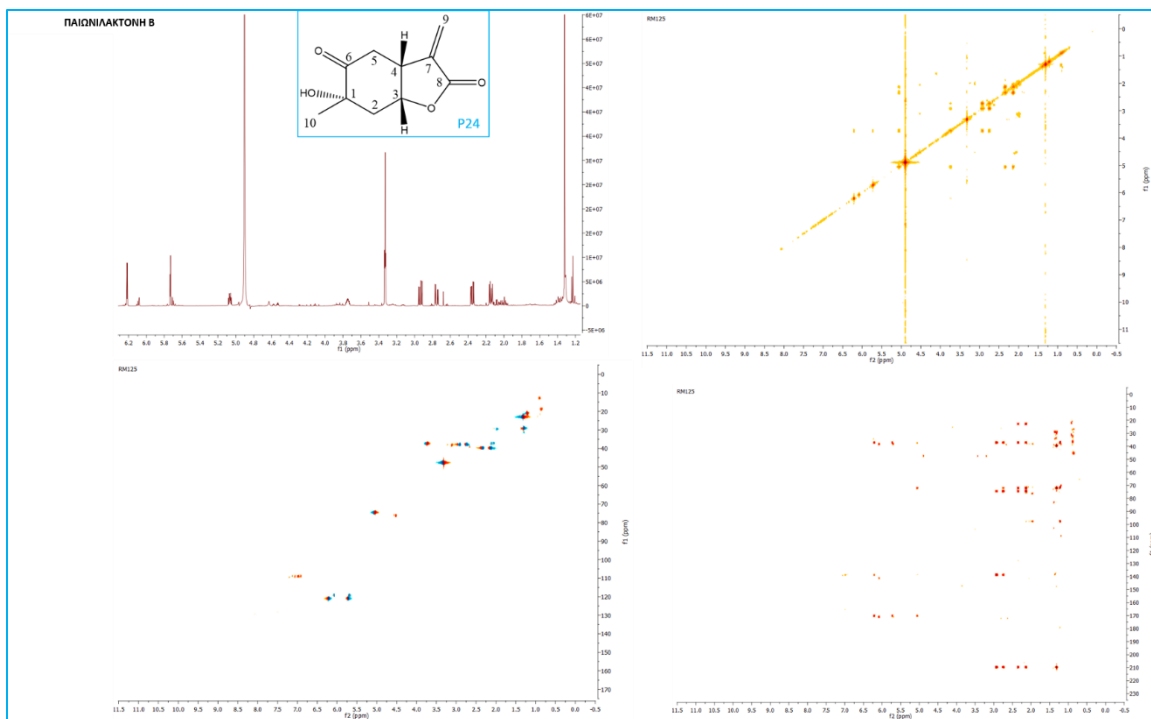
Εικόνα 231. ¹H-NMR φάσμα ακτεοΐδη (MeOD)



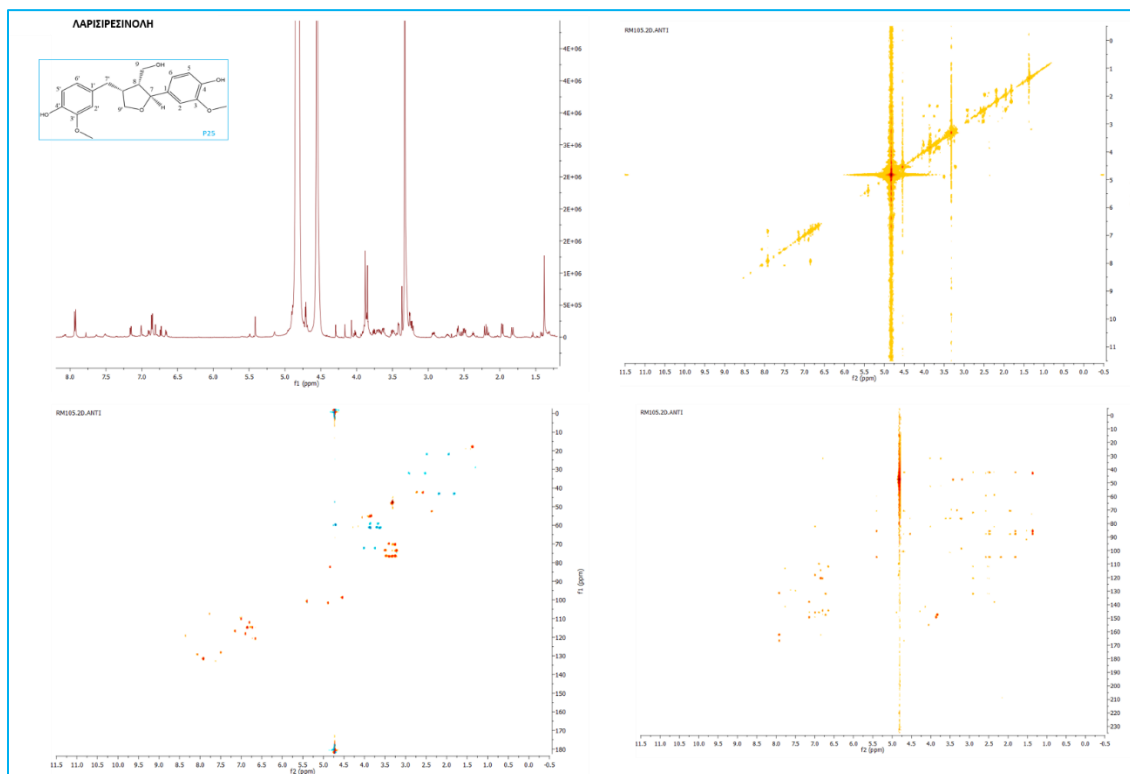
Εικόνα 232. Φάσματα NMR 3-O-σοφοροσίδη λιμοσιτρίνης(MeOD)



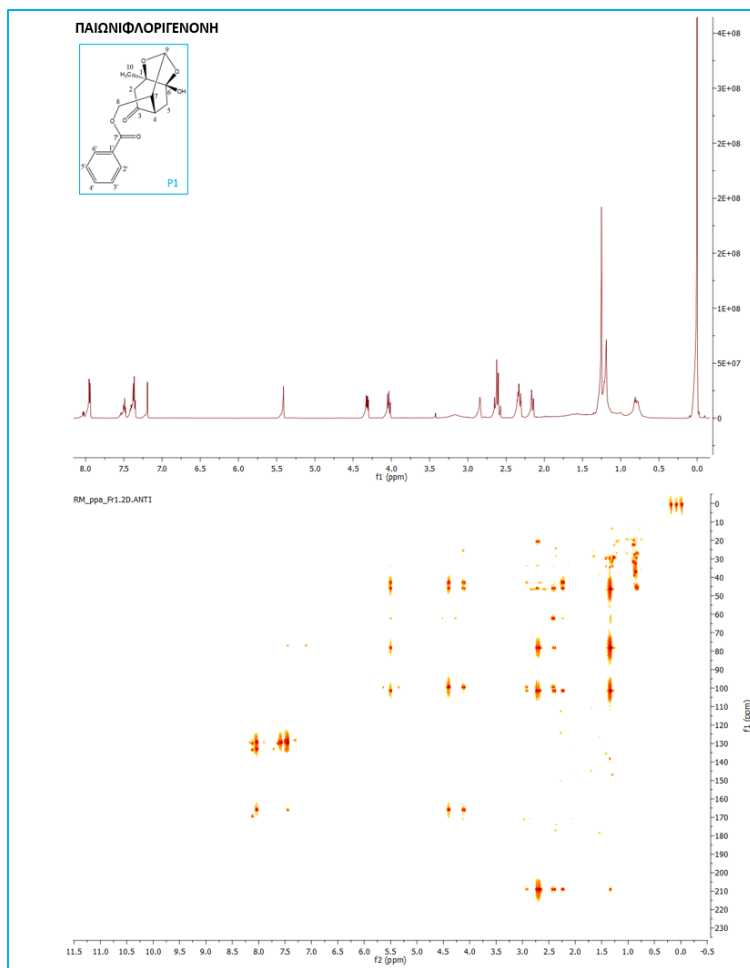
Εικόνα 233. Φάσματα NMR 3,3'-διμεθοξυ-4-σουλφοξυελλαγικού οξέος (MeOD)



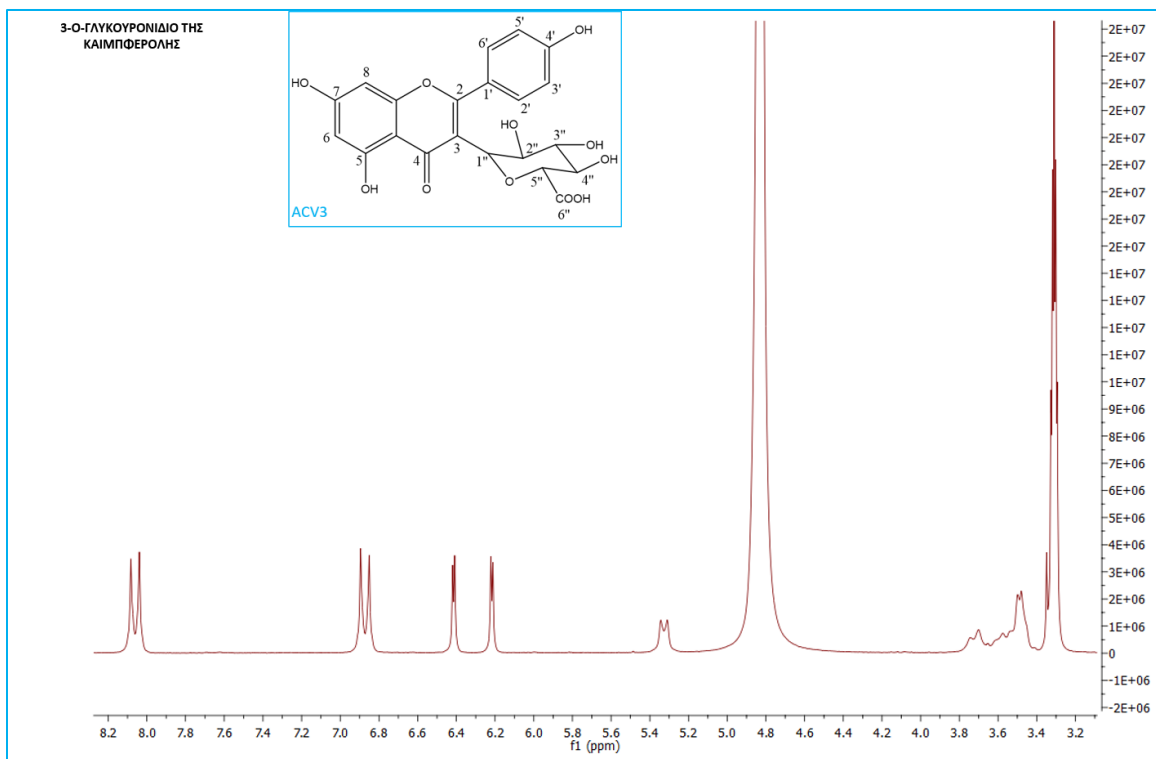
Εικόνα 234. Φάσματα NMR παιωνιλακτόνης Β (MeOD)



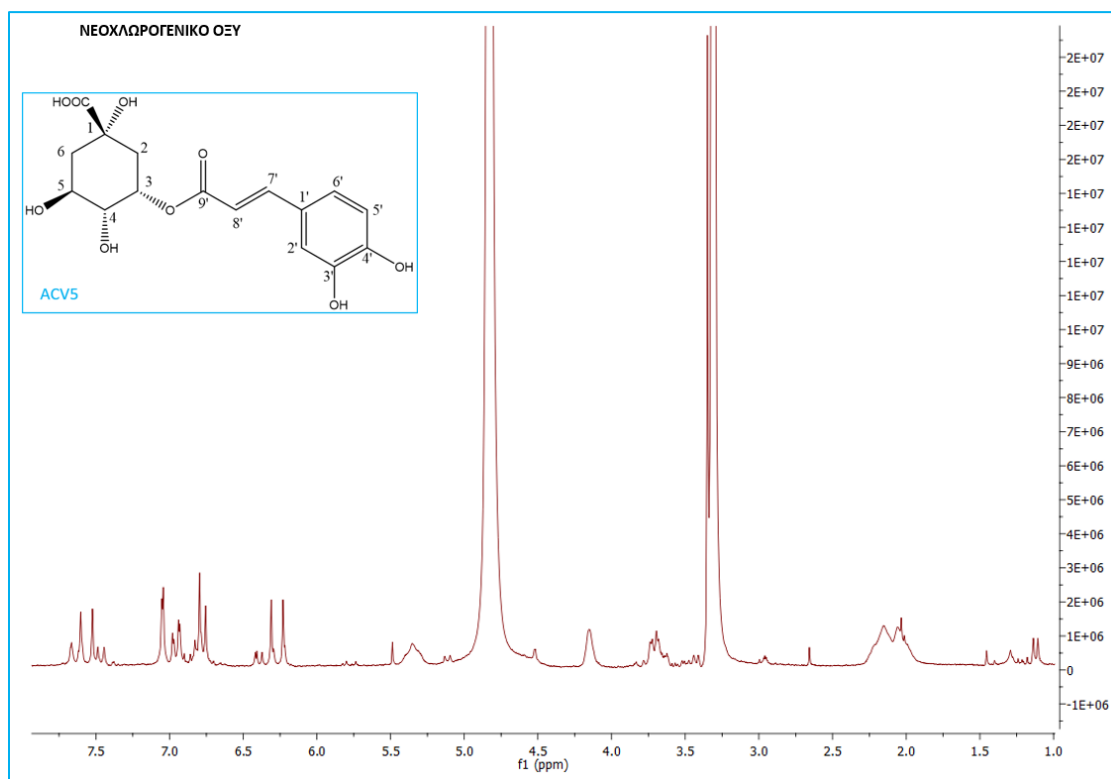
Εικόνα 235. Φάσματα NMR λαρισιρεινόλης (MeOD)



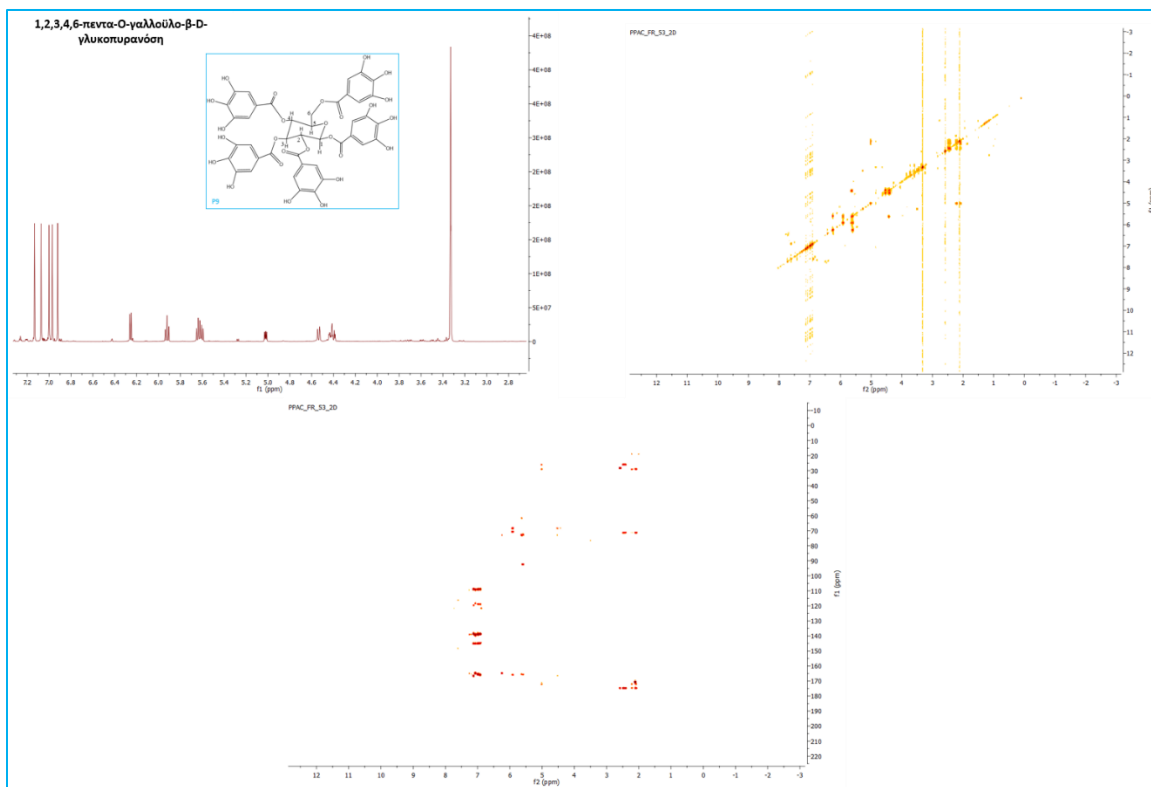
Εικόνα 236. Φάσματα NMR παιωνιφλοριγενόνης (CDCl₃)



Εικόνα 237. $^1\text{H-NMR}$ φάσμα 3-Ο-γλυκουρονιδίου καμπφερόλης (MeOD)



Εικόνα 238. $^1\text{H-NMR}$ φάσμα νεοχλωρογενικού οξέος (MeOD)



Εικόνα 239. Φάσματα NMR β-PGG (MeOD)