

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ: ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ**



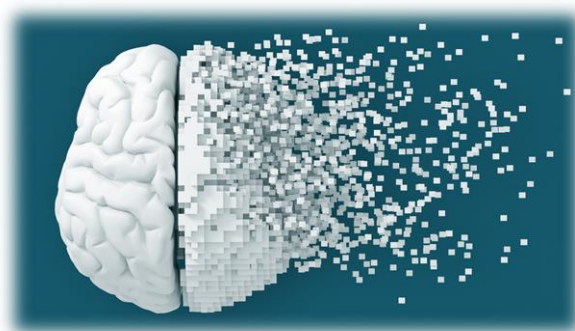
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΓΗ
ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΟ ΕΛΕΓΧΟ
ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΩΝ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

**EXPLOITATION OF CELL CULTURES BY USING MOLECULAR
METHODOLOGIES FOR THE PHARMACOLOGICAL ASSESSMENT OF
DIETARY SUPPLEMENTS AND PHARMACEUTICAL PRODUCTS**

ΚΟΥΝΤΟΥΡΑ ΛΟΥΚΙΑ

ΧΗΜΙΚΟΣ (Α.Ε.Μ.: 0047)



ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2023

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ: ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΓΗ
ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΟ ΕΛΕΓΧΟ
ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΩΝ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

**EXPLOITATION OF CELL CULTURES BY USING MOLECULAR
METHODOLOGIES FOR THE PHARMACOLOGICAL ASSESSMENT OF
DIETARY SUPPLEMENTS AND PHARMACEUTICAL PRODUCTS**

ΚΟΥΝΤΟΥΡΑ ΛΟΥΚΙΑ

ΧΗΜΙΚΟΣ (Α.Ε.Μ. 0047)

Εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής,
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Ελλάδα

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**ΙΩΑΝΝΗΣ ΒΙΖΙΡΙΑΝΑΚΗΣ: ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΤΜΗΜΑ
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ Α.Π.Θ. (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)**

**ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΦΑΤΟΥΡΟΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
Α.Π.Θ.**

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΠΑΝΤΑΖΑΚΗ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ, ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ Α.Π.Θ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αυτή η μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία στοχεύει στην αξιολόγηση συστατικών που χρησιμοποιούνται σε συμπληρώματα διατροφής και φαρμακευτικά προϊόντα και τα οποία έχουν ως βάση το ελαιόλαδο που περιέχει σε υψηλά ποσοστά φαινολικές ενώσεις και το οποίο θα είναι εμπλουτισμένο με πληθώρα φυσικών συστατικών με αντιοξειδωτική δράση. Τέτοια σκευάσματα αξιολογούνται και ως προς τη δράση τους στη νοητική ενδυνάμωση με στόχο την βελτίωση συμπτωμάτων των ασθενών της νόσου Αλτσχάιμερ. Ειδικότερα, μελετάται η ζωτικότητα και κυτταροτοξικότητα του προαναφερθέντος μείγματος ελιάς με τα φυσικά συστατικά σε ηπατικά καρκινικά κύτταρα HepG2, κύτταρα ζωτικής σημασίας για τον μεταβολισμό των ξеноβιοτικών και των φαρμάκων, μια διαδικασία καθοριστική για τη βιοδιαθεσιμότητα τους στον οργανισμό.

Ειδικότερα, ο έλεγχος της ηπατοτοξικότητας πραγματοποιήθηκε μέσω απομόνωσης RNA και μέτρησης - ποσοτικοποίησης της γονιδιακής έκφρασης με χρήση της μεθόδου real time-Quantitative PCR (Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης-πραγματικού χρόνου). Ταυτόχρονα, αξιολογείται η μορφή του φυσικού εκχυλίσματος σε σύγκριση με την χημική μορφή των συστατικών που εμπεριέχονται στο προϊόν καθώς επίσης και η επίδραση της μορφής πρόσληψης των προστιθέμενων συστατικών στην εμφάνιση κυτταρικής τοξικότητας.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας στοχεύουν στο να τεκμηριώσουν με επιστημονικό τρόπο την φαρμακολογική συμπεριφορά φυσικών προϊόντων. Με αυτόν τον τρόπο, σε αυτή την εργασία, οι σύγχρονες φαρμακολογικές δοκιμασίες θα μπορούν να επιβεβαιώσουν σε αυτό το επίπεδο εάν η χρήση τόσο του ελαιόκαρπου όσο και των φυσικών αντιοξειδωτικών με την ανάπτυξη ενός νέου λειτουργικού τροφίμου θα μπορούσε να αξιοποιηθεί για την πρόληψη της έναρξης και την επιβράδυνση της εξέλιξης των συμπτωμάτων των νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Η περαιτέρω επιστημονική και ερευνητική προσπάθεια κρίνεται απαραίτητη για την επιβεβαίωση των σχετικά εμπλεκόμενων μηχανισμών αλλά και των σηματοδοτικών μονοπατιών με τη φαρμακολογική δράση αυτών των ενώσεων στη βελτίωση της συμπτωματολογίας ασθενειών του νευρικού συστήματος.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Συμπληρώματα διατροφής, φαρμακευτικά προϊόντα, Φυσικά Προϊόντα, Αντιοξειδωτικά, Ελαιοκαρπός, Βιταμίνες, Οξειδωτικό στρες,

Κυτταροκαλλιέργειες, Ηπατοτοξικότητα, qPCR, HepG2

ABSTRACT

This postgraduate thesis aims to evaluate ingredients used in nutritional supplements and pharmaceutical products based on olive oil containing high phenolic compounds and which will be enriched with a plethora of natural ingredients with antioxidant action. Such preparations are also evaluated for their action on mental empowerment in order to improve symptoms of Alzheimer's disease patients. In particular, the vitality and cytotoxicity of the aforementioned olive mixture with the natural ingredients in HepG2 liver cancer cells, cells vital for the metabolism of xenobiotics and drugs, a process that is crucial for their bioavailability in the body.

In particular, the control of hepatotoxicity was carried out through RNA isolation and measurement - quantification of gene expression using the real time-Quantitative PCR (real-time polymerase chain reaction) method. At the same time, the form of the natural extract is evaluated compared to the chemical form of the ingredients contained in the product as well as the effect of the intake form of the added ingredients on the occurrence of cellular toxicity.

The results of this paper aim at documenting in a scientific way the pharmacological behavior of natural products. In this way, in this work, modern pharmacological tests will be able to confirm at this level whether the use of both olive fruit and natural antioxidants in the development of a new functional food could be exploited to prevent the onset and slow the progression of symptoms of neurodegenerative diseases. Further scientific and research effort is necessary to confirm the relevant mechanisms and signaling pathways with the pharmacological action of these compounds in improving the symptomatology of nervous system diseases.

KEYWORDS: Nutritional supplements, Pharmaceuticals, Natural Products, Antioxidants, Olive Fruit, Vitamins, Oxidative stress, Cell cultures, Hepatotoxicity, qPCR, HepG2

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (Α.Π.Θ.).

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα για αυτή την εργασία κ. Ιωάννη Βιζιριανάκη, Αναπληρωτή Καθηγητή Μοριακής Φαρμακολογίας και Φαρμακογονιδιοματικής, του Τμήματος Φαρμακευτικής, Α.Π.Θ., για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, όπως επίσης και για την χρήσιμη βοήθεια του σε ότι ήταν απαραίτητο. Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ για την επιστημονική καθοδήγηση, τη διαρκή επικοινωνία και στήριξη καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων και της συγγραφής της εργασίας.

Ταυτόχρονα θα ήθελα να ευχαριστήσω την εταιρεία YANNI'S OLIVE GROVE για την γενναιόδωρη χορηγία του προϊόντος MICOLIVE, καθώς επίσης και την παραχώρηση των αντιοξειδωτικών συστατικών για την δημιουργία του προς έρευνα δείγματος του προϊόντος.

Ακόμα ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Δρ. Φανή Χατζοπούλου, Επιστημονικός Συνεργάτης στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, ΑΠΘ, για την βοήθεια και τη συμβολή της στην διαδικασία της ανάλυσης RT-qPCR των δειγμάτων RNA στην εταιρεία LABNet με την παραχώρηση του κατάλληλου εξοπλισμού.

Τέλος, ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου: την Σοφία, την Αλίκη, τον Νίκο, την Ρόζμαρη, την Κατερίνα και τον Αλέξανδρο για τη στήριξη, τις συμβουλές τους και την άψογη συνεργασία μας καθ' όλη την διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων της διπλωματικής μου εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ABSTRACT	5
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	6
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	16
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	18
1.1 ΝΟΣΟΣ ALZHEIMER'S	22
1.1.1 ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ.....	22
1.1.2 ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ.....	23
1.2 ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ	30
1.2.1 ΗΛΙΚΙΑ.....	30
1.2.2 ΧΑΜΗΛΟ ΕΠΙΠΕΔΟ ΜΟΡΦΩΣΗΣ.....	30
1.2.3 ΔΙΑΒΗΤΗΣ	31
1.2.4 ΥΠΕΡΤΑΣΗ	31
1.2.5 ΓΟΝΙΔΙΟ ΑΡΟΕ	31
1.2.6 ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ 21	32
1.2.7 ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ 14/ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ 1.....	33
1.2.8 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	33
1.2.9 ΚΕΚ.....	34
1.2.10 ΚΑΠΝΙΣΜΑ	34
1.2.11 ΚΑΤΑΘΛΙΨΗ	34
1.2.12 ΑΛΛΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	35
1.3 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	36
1.3.1 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ	37
1.3.2 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	39
1.3.3 ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ.....	40
1.3.4 ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ Αβ.....	41
1.3.5 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΑΥ	42
1.4 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΑΡΕΜΒΑΣΕΙΣ	43
1.4.1 ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ.....	44
1.4.2 ΠΟΛΥΤΡΟΠΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ.....	47
1.4.3 ΝΕΥΡΟΨΥΧΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ.....	48
1.4.4 ΜΑΓΝΗΤΙΚΗ ΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ(MRI).....	48

1.4.5	ΗΛΕΚΤΡΟΕΓΚΕΦΑΛΟΓΡΑΦΙΑ (EEG).....	50
1.4.6	ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	51
1.5	ΝΕΥΡΩΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΚΑΙ ΔΥΣΚΟΛΙΑ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ.....	56
1.6	ΦΥΣΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΩΣ ΤΡΟΠΟΣ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ	59
1.6.1	ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΣ.....	61
1.6.2	ΒΙΤΑΜΙΝΗ Ε.....	63
1.6.3	ΕΛΕΥΡΩΠΑΪΝΗ ΚΑΙ ΦΑΙΝΟΛΕΣ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ	64
1.6.4	ΩΜΕΓΑ-3 (DHA FATTY ACID).....	67
1.7	ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΗΠΑΡ	68
2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	72
2.1	ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ HepG2 ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	72
2.2	ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	73
2.2.1	ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΣΕ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΤΡΥΨΙΝΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΜΟΙΡΑΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (SPLIT)	73
2.2.2	ΠΑΓΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	75
2.2.3	ΑΠΟΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	76
2.2.4	ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΠΛΑΚΑΣ Neubauer	77
2.2.5	ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΤΑΛΛΗΛΩΝ ΜΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΡΟΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ.....	78
2.2.6	ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗΝ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ (CCK-8 ASSAY).....	80
2.3	ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ	82
2.3.1	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA.....	82
2.3.2	ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ RNA	84
2.4	REAL TIME QUANTITATIVE POLYMERASE CHAINREACTION (RT-qPCR).	85
2.4.1	ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΓΕΝΟΣΩΜΙΚΟΥ DNA (Genomic DNA- gDNA)	85
2.4.2	ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΤΟΥ RNA.....	85
2.4.3	ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (REAL TIME QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION, RT- qPCR) .	86
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	91
3.1	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ – ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ (CCK-8 ASSAY).....	91
3.1.1	ΠΡΟΤΥΠΗ ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ HepG2	91

3.1.2	ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ (CCK-8 ASSAY) – ΔΟΣΟΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ	93
3.1.3	ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ (CCK-8 ASSAY) – ΧΡΟΝΟΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ	101
3.2	ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕΣΩ REAL TIME QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION (RT- qPCR) ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥ RT2 Profiler PCR Array	119
4	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	146
5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	148

ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Εκτιμώμενη διάρκεια ζωής συγκριτικά με το φύλο και την ηλικία (Maslow, 2010).	19
Εικόνα 2: Στάδια στη συνέχεια της νόσου του Αλτσχάιμερ (Porsteinsson, Isaacson, Knox, Sabbagh, & Rubino, 2021).	19
Εικόνα 3: Παράγοντες σε κλινικές δοκιμές για τη θεραπεία της νόσου Αλτσχάιμερ το 2021 (J. Cummings, Lee, Zhong, Fonseca, & Taghva, 2021).	21
Εικόνα 4: Σχέση μεταξύ της εξέλιξης των γνωστικών και λειτουργικών συμπτωμάτων και των νευροπαθολογικών συμβάντων κατά την μετάβαση από την ασυμπτωματική νόσο Alzheimer's (AD) σε ήπια γνωστική εξασθένηση λόγω AD και κλινικά έκδηλη άνοια τύπου AD (Forlenza, Diniz, & Gattaz, 2010).	23
Εικόνα 5: Υποθετικό μοντέλο των παθολογικών διεργασιών στη νόσο Alzheimer (AD), εστιάζοντας στο πεπτίδιο αμυλοειδούς β (AB) (Forlenza, Diniz, & Gattaz, 2010).	25
Εικόνα 6: Υπόθεση για την παθοφυσιολογία της νόσου του Αλτσχάιμερ (Noori, Dehpour, Sureda, Sobarzo-Sanchez, & Shirooie, 2021).	26
Εικόνα 7: Φυσιολογία της χολινεργικής σύναψης (Harald Hampel et al., 2018).	29
Εικόνα 8: Παραγωγή ROS με μη φυσιολογική αντίδραση του O ₂ με δεσμευμένο σε πρωτεΐνες Fe ή Cu (Barnham, Masters, & Bush, 2004).	38
Εικόνα 9: Μοριακοί μηχανισμοί και παθολογία στο AD (Praticò, 2008)	42
Εικόνα 10: Πολυλειτουργικοί διαμορφωτές που στοχεύουν πολλαπλές παθολογικές οδούς ασθένειας της AD (Govindaraju & Ramesh, 2022).	43
Εικόνα 11: Βιοδείκτες σε ENY, αίμα, σάλιο και ούρα για τη διάγνωση της AD (Govindaraju & Ramesh, 2022).	46
Εικόνα 12: Πολυπλεξία και πολυτροπική προσέγγιση για έγκαιρη και ακριβή διάγνωση της AD (Govindaraju & Ramesh, 2022).	47
Εικόνα 13: Προοδευτική ατροφία σε ηλικιωμένους με γνωστικά φυσιολογικούς (CN), με αμνητική ήπια γνωστική εξασθένηση (aMCI) και με θέματα νόσου Αλτσχάιμερ (AD) (C. R. Jack, 2011).	50
Εικόνα 14: Ένα σταδιακό γράφημα για την επισήμανση βασικών σταδίων στη διαγνωστική διαδικασία, μαζί με τις συνιστώμενες δοκιμές για την υποστήριξη κάθε βήματος (Porsteinsson, Isaacson, Knox, Sabbagh, & Rubino, 2021).	51
Εικόνα 15: Χημική δομή των FDA-εγκεκριμένων φαρμάκων για την AD. Α) Δονεπεζίλη, Β) Γαλανταμίνη, Γ) Ριβαστιγμίνη, Δ) Τακρίνη, Ε) Μεμαντίνη (Ansari & Khodagholi, 2013). ..	56
Εικόνα 16: Οι διαδικασίες που συμβάλλουν στο σχηματισμό νευροεκφυλιστικών ασθενειών (Hung, Chen, Hsieh, Chiou, & Kao, 2010).	58
Εικόνα 17: Βιολογικές δραστηριότητες φαινολικών ενώσεων ελαίου της ελιάς (Cicerale, Conlan, Sinclair, & Keast, 2008).	62
Εικόνα 18: Φαρμακολογικές επιδράσεις της ελαιοευρωπαϊνης (Haris Omar, 2010).	66
Εικόνα 19: Διαγραμματική αναπαράσταση του νευροπροστατευτικού ρόλου της ελευρωπαϊνης (Haris Omar, 2010).	66
Εικόνα 20: Καλλιέργεια κυττάρων HepG2.	73
Εικόνα 21: Καλλιέργεια κυττάρων HepG2 έπειτα από αραίωση (split) που επιτρέπει την ανάπτυξη τους.	75
Εικόνα 22: Πλάκα Neubauer	78

Εικόνα 23: CCK-8 96-well plate χρονοεξαρτώμενο.	82
Εικόνα 24: Φάσεις DNA και RNA (εικόνα από QuantiTech Reverse Transcription handbook)	84
Εικόνα 25: Βήματα παραγωγής αντίστροφης μεταγραφής (εικόνα από QuantiTech Reverse Transcription handbook).	86
Εικόνα 26: Διαβάθμιση array 2 (96 γονίδια – 1 δείγμα ανά πλάκα) (εικόνες από QuantiTech Reverse Transcription handbook).....	87

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Επιδράσεις των φυσικών προϊόντων στη θεραπεία της νόσου του Αλτσχάιμερ (Ansari & Khodagholi, 2013) (Noori, Dehpour, Sureda, Sobarzo-Sanchez, & Shirooie, 2021)	61
Πίνακας 2: Υπεροικογένεια ανθρώπινου κυτοχρώματος P ₄₅₀ (Herrlinger & Klotz, 2001)....	70
Πίνακας 3: Συστατικά δειγμάτων	79
Πίνακας 4: Εμπειροχόμενα γονίδια(πίνακας από QuantiTech Reverse Transcription handbook).....	89
Πίνακας 5: Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης αναφοράς.....	91
Πίνακας 6: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση 24 ωρών με το μείγμα 1.....	94
Πίνακας 7: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση 24 ωρών με το μείγμα 2.....	94
Πίνακας 8: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση 24 ωρών – control δείγμα...	94
Πίνακας 9: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση 48 ωρών με το μείγμα 1.....	94
Πίνακας 10: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση 48 ωρών με το μείγμα 2....	95
Πίνακας 11: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση 24 ωρών – control δείγμα .	95
Πίνακας 12: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 24 ωρών με το μείγμα 1 (χρονο-εξαρτώμενο).....	102
Πίνακας 13: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 24 ωρών με το μείγμα 2 (χρονο-εξαρτώμενο).....	102
Πίνακας 14: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης της καλλιέργειας control για διάστημα 24 ωρών (χρονο-εξαρτώμενο).....	102
Πίνακας 15: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 48 ωρών με το μείγμα 1 (χρονο-εξαρτώμενο).....	102
Πίνακας 16: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 48 ωρών με το μείγμα 2 (χρονο-εξαρτώμενο).....	103
Πίνακας 17: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης καλλιέργειας control για διάστημα 48 ωρών (χρονο-εξαρτώμενο).....	103
Πίνακας 18: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 72 ωρών με το μείγμα 1 (χρονο-εξαρτώμενο).....	103
Πίνακας 19: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 72 ωρών με το μείγμα 2 (χρονο-εξαρτώμενο).....	103
Πίνακας 20: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης καλλιέργειας control για διάστημα 72 ωρών (χρονο-εξαρτώμενο).....	103
Πίνακας 21: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 96 ωρών με το μείγμα 1 (χρονο-εξαρτώμενο).....	104
Πίνακας 22: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 96 ωρών με το μείγμα 2 (χρονο-εξαρτώμενο).....	104
Πίνακας 23: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης καλλιέργειας control για διάστημα 96 ωρών (χρονο-εξαρτώμενο).....	104
Πίνακας 24: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 120 ωρών με το μείγμα 1 (χρονο-εξαρτώμενο).....	104
Πίνακας 25: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 120 ωρών με το μείγμα 2 (χρονο-εξαρτώμενο).....	104

Πίνακας 26: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης καλλιέργειας control για διάστημα 120 ωρών (χρονο-εξαρτώμενο)	105
Πίνακας 27: Αποτελέσματα Ct όπως προσδιορίστηκαν με την κατάλληλη ανάλυση του πάνελ γονιδίων (Qiagen Data Analysis software)	121
Πίνακας 28: Συνολικά αποτελέσματα RT-qPCR για μείγμα 2A.....	124
Πίνακας 29: Συνολικά αποτελέσματα RT-qPCR για μείγμα 1A.....	126
Πίνακας 30: Συνολικά αποτελέσματα RT-qPCR συγκριτικά.....	128
Πίνακας 31: Λειτουργία γονιδίων και μονοπάτια που επηρεάζουν στον οργανισμό (Gene Database, 2023)	143

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Πρότυπη καμπύλη αρχικής συγκέντρωσης των κυττάρων HepG2, $5 \cdot (10^4)$	91
Σχήμα 2: Πρότυπη καμπύλη αρχικής συγκέντρωσης των κυττάρων HepG2, $2,5 \cdot (10^4)$	92
Σχήμα 3: Πρότυπη καμπύλη αρχικής συγκέντρωσης των κυττάρων HepG2, $1,25 \cdot (10^4)$	92
Σχήμα 4: Πρότυπη καμπύλη αρχικής συγκέντρωσης των κυττάρων HepG2, $6,25 \cdot (10^3)$	92
Σχήμα 5: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώση για χρονικό διάστημα 24-48 ωρών με το μείγμα 1 (10μg) 1.....	95
Σχήμα 6: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώση για χρονικό διάστημα 24-48 ώρες με το μείγμα 1 (10μg) 2.....	96
Σχήμα 7: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώση για χρονικό διάστημα 24-48 ωρών με το μείγμα 2 (10μg) 1.....	96
Σχήμα 8: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώση για χρονικό διάστημα 24-48 ωρών με το μείγμα 2 (10μg) 2.....	97
Σχήμα 9: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώση για χρονικό διάστημα 24-48 ώρες με το μείγμα 1 (5μg) 1.....	97
Σχήμα 10: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώση για χρονικό διάστημα 24-48 ώρες με το μείγμα 1 (5μg) 2.....	98
Σχήμα 11: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώση για χρονικό διάστημα 24-48 ώρες με το μείγμα 2 (5μg) 1.....	98
Σχήμα 12: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώση για χρονικό διάστημα 24-48 ώρες με το μείγμα 2 (5μg) 2.....	99
Σχήμα 13: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώση για χρονικό διάστημα 24-48 ώρες με το μείγμα 1 (2μg) 1.....	99
Σχήμα 14: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώση για χρονικό διάστημα 24-48 ώρες με το μείγμα 1 (2μg) 2.....	100
Σχήμα 15: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώση για χρονικό διάστημα 24-48 ώρες με το μείγμα 2 (2μg) 1.....	100
Σχήμα 16: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώση για χρονικό διάστημα 24-48 ώρες με το μείγμα 2 (2μg) 2.....	101
Σχήμα 17: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώση για χρονικό διάστημα 24 ωρών με το μείγμα 1 (χρονο-εξαρτώμενο) 1.....	105
Σχήμα 18: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώση για χρονικό διάστημα 24 ωρών με το μείγμα 1 (χρονο-εξαρτώμενο) 2.....	105
Σχήμα 19: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώση για χρονικό διάστημα 24 ωρών με το μείγμα 2 (χρονο-εξαρτώμενο) 1.....	106
Σχήμα 20: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώση για χρονικό διάστημα 24 ωρών με το μείγμα 2 (χρονο-εξαρτώμενο) 2.....	106
Σχήμα 21: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώση για χρονικό διάστημα 48 ωρών με το μείγμα 1 (χρονο-εξαρτώμενο) 1.....	107
Σχήμα 22: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώση για χρονικό διάστημα 48 ωρών με το μείγμα 1 (χρονο-εξαρτώμενο) 2.....	107
Σχήμα 23: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώση για χρονικό διάστημα 48 ωρών με το μείγμα 2 (χρονο-εξαρτώμενο) 1.....	108

Σχήμα 24: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 48 ωρών με το μείγμα 2 (χρονο-εξαρτώμενο) 2.....	108
Σχήμα 25: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 72 ωρών με το μείγμα 1 (χρονο-εξαρτώμενο) 1.....	109
Σχήμα 26: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 72 ωρών με το μείγμα 1 (χρονο-εξαρτώμενο) 2.....	109
Σχήμα 27: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 72 ωρών με το μείγμα 2 (χρονο-εξαρτώμενο) 1.....	110
Σχήμα 28: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 72 ωρών με το μείγμα 2 (χρονο-εξαρτώμενο) 2.....	110
Σχήμα 29: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 96 ωρών με το μείγμα 1 (χρονο-εξαρτώμενο) 1.....	111
Σχήμα 30: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 96 ωρών με το μείγμα 1 (χρονο-εξαρτώμενο) 2.....	111
Σχήμα 31: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 96 ωρών με το μείγμα 2 (χρονο-εξαρτώμενο) 1.....	112
Σχήμα 32: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 96 ωρών με το μείγμα 2 (χρονο-εξαρτώμενο) 2.....	112
Σχήμα 33: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 120 ωρών με το μείγμα 1 (χρονο-εξαρτώμενο) 1.....	113
Σχήμα 34: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 120 ωρών με το μείγμα 1 (χρονο-εξαρτώμενο) 2.....	113
Σχήμα 35: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 120 ωρών με το μείγμα 2 (χρονο-εξαρτώμενο) 1.....	114
Σχήμα 36: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 120 ωρών με το μείγμα 2 (χρονο-εξαρτώμενο) 2.....	114
Σχήμα 37: Συνολική αξιολόγηση της κυτταρικής επιβίωσης παρουσία των φυσικών εκχυλισμάτων (μείγμα 1) 1.....	115
Σχήμα 38: Συνολική αξιολόγηση της κυτταρικής επιβίωσης παρουσία των φυσικών εκχυλισμάτων (μείγμα 1) 2.....	115
Σχήμα 39: Συνολική αξιολόγηση της κυτταρικής επιβίωσης παρουσία των φυσικών εκχυλισμάτων (μείγμα 2) 1.....	116
Σχήμα 40: Συνολική αξιολόγηση της κυτταρικής επιβίωσης παρουσία των φυσικών εκχυλισμάτων (μείγμα 2) 2.....	116
Σχήμα 41: Συνολική αξιολόγηση της κυτταρικής επιβίωσης παρουσία των καθαρών βιταμινών (μείγμα 1) 1.....	117
Σχήμα 42: Συνολική αξιολόγηση της κυτταρικής επιβίωσης παρουσία των καθαρών βιταμινών (μείγμα 1) 2.....	117
Σχήμα 43: Συνολική αξιολόγηση της κυτταρικής επιβίωσης παρουσία των καθαρών βιταμινών (μείγμα 2) 1.....	118
Σχήμα 44: Συνολική αξιολόγηση της κυτταρικής επιβίωσης παρουσία των καθαρών βιταμινών (μείγμα 2) 2.....	118
Σχήμα 45: 3D Διάγραμμα αυξομείωσης γονιδιακής έκφρασης δείγμα 2A.....	130
Σχήμα 46: 3D Διάγραμμα αυξομείωσης γονιδιακής έκφρασης δείγμα 1A.....	130
Σχήμα 47: Scatter plot δείγμα 2A.....	131
Σχήμα 48: Scatter plot δείγμα 1A.....	131

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

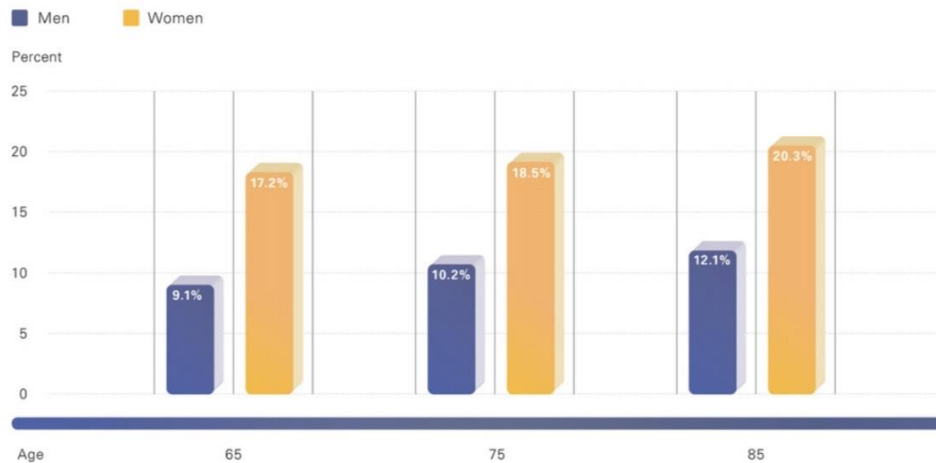
AD:	Νόσος Alzheimer's
EOAD	Πρώιμη έναρξη AD
FDA	Food and Drug Administration
CIs	Αναστολείς χαλινεστεράσης
NMDA	Υποδοχείς N-μεθυλ- $\ddot{\nu}$ -ασπαρτικού
NFT	Νευροϊνιδιακά μπερδέματα
APP	Πρόδρομες πρωτεΐνες αμυλοειδούς
PS1	Γενετική μετάλλαξη
PS2	Γενετική μετάλλαξη
PHF	Δέσμες ζευγαρωμένων ελικοειδών νημάτων
DAMPs	Επικίνδυνα μοριακά πρότυπα
ChAT	Ακετυλοτρανσφεράση χολίνης
NBM	Χολινεργικοί νευρώνες
Ach	Ακετυλοχολίνη
Ch4	Πυρήνας basalis
ChEIs	Αναστολείς χολινεστεράσης
AcCoA	Ακετυλο συνένζυμο A
APOE	Mini Mental State Examination (Εξέταση)
ROS	Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου
CSF ή ENY	Εγκεφαλονωτιαίο υγρό
AGE	Τελικά προϊόντα προχωτημένης γλυκοζήλιωσης
RNS	Ελεύθερες ρίζες αζώτου
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
KGDHC	Σύμπλεγμα α-κετογλουταρικής αφυδρογονάσης
PDHC	Σύμπλοκο πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης
MRI	Απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού
PET	Τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων
NIRF	Απεικόνιση υπέρυθρου φθορισμού
MS	Φασματομετρία μάζας
ELISA	Ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία
p-Tau	Πλάσμα Phospho Tau
sTREM2	Υποδοχέας ενεργοποίησης
YKL-40:	Βιοδείκτης AD
NF-L	Πρωτεϊνικός δείκτης Neurolament
EC	Ενδορρινικός φλοιός
WMH	Τεχνική τμηματοποίησης και χαρτογράφησης MRI
sMRI	Δομική απεικόνιση MRI
fMRI	Λειτουργική απεικόνιση MRI
CN	Γνωστικά φυσιολογικοί ασθενείς
EEG	Εγκεφαλογράφημα
MOA	Μηχανισμός δράσης
AChE	Αναστολέας ακετυλοχολινεστεράσης

nAChRs	Αλλοστερικός νικοτινικός ρυθμιστής υποδοχέα ακετυλοχολίνης
PD	Νόσος Parkinson
ALS	Αμυλοτροφική πλευρική σκλήρυνση
BBB	Αιματοεγκεφαλικός φραγμός
ECG	Γαλλική επικατεχίνη
LDL	Λιποπρωτεΐνη
HDL	Λιποπρωτεΐνη
DHA	Δεϋδροασκορβικό οξύ
PUFAs	Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
UGT	Γλυκουρονιδίωση της διφωσφορικής ουριδίνης
CYP	Ένζυμα του κυτοχρώματος P450
ER	Ενδοπλασματικό δίκτυο
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute
FBS	Fetal Bovine Serum Εμβρυϊκός Βόειος Ορός
WST	Υδατοδιαλυτά άλατα τετραζολίου
PS	Διάλυμα πενικιλίνης (100μονάδες/mL) με στρεπτομικίνη (100mg/mL)
WSTs	Άλατα τετραζολίου
MTT	Χρωματομετρική δοκιμασία άλατος τετραζολίου
CCK-8	Dojindo Cell Counting Kit-8
RT-qPCR	Realtime quantitative polymerase chain reaction

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το πιο διαδεδομένο είδος άνοιας που προκαλείται από μια προοδευτική νευρολογική διαταραχή είναι η νόσος του Alzheimer's (AD). Είναι μια διαταραχή που επηρεάζει την μνήμη και σκέψη των ηλικιωμένων και είναι σταδιακή, μόνιμη και σχετίζεται με την ηλικία. Η διαταραχή του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, το οξειδωτικό στρες, η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, η νευροφλεγμονή και ο υπομεταβολισμός είναι τα κύρια χαρακτηριστικά αυτής της ασθένειας (Mendiola-Precoma, Berumen, Padilla, & Garcia-Alcocer, 2016). Η πλειονότητα των περιπτώσεων όψιμης έναρξης AD εμφανίζονται μετά την ηλικία των 65 ετών, ενώ οι περιπτώσεις που εμφανίζονται πριν από αυτήν την ηλικία είναι σημαντικά λιγότερο συχνές, λιγότερο από το 5% όλων των περιπτώσεων και αναφέρονται ως πρόιμη έναρξη AD (EOAD) (Long & Holtzman, 2019).

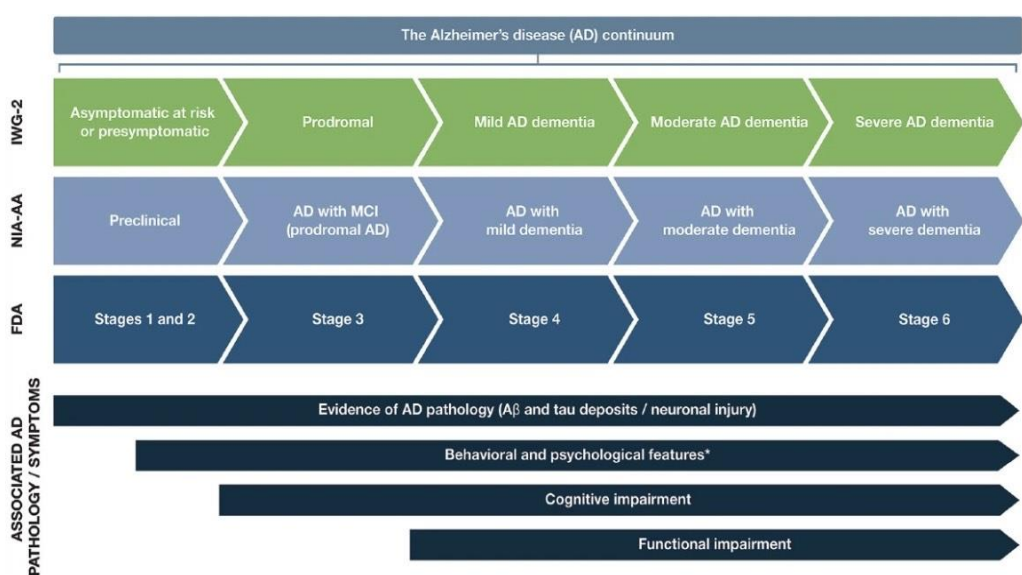
Σύμφωνα με τη διεθνή νόσο του Alzheimer's (AD), υπήρχαν περίπου πενήντα εκατομμύρια πάσχοντες από άνοια παγκοσμίως το 2017 και μέχρι το 2050, ο αριθμός αυτός αναμένεται να τριπλασιαστεί (Noori, Dehpour, Sureda, Sobarzo-Sanchez, & Shirooie, 2021). Μετά την ηλικία των 65 ετών, έχει θεωρηθεί ότι η πιθανότητα εμφάνισης ασθένειας AD διπλασιάζεται κάθε πέντε χρόνια. Πολυάριθμες επιδημιολογικές έρευνες που διεξήχθησαν στο παρελθόν αποκάλυψαν ότι οι γυναίκες άνω των 85 ετών είχαν υψηλότερο ποσοστό ανάπτυξης AD από τους άνδρες της ίδιας ηλικίας (Dey, Bhattacharya, Mukherjee, & Pandey, 2017). Για τις γυναίκες άνω των 65 ετών, ο κίνδυνος για AD κυμαίνεται από 12% έως 19%, ενώ για τους άνδρες κυμαίνεται από 6% έως 10%. Παρά το γεγονός ότι η κατάσταση μπορεί να συνεχιστεί έως και 20 χρόνια, οι ασθενείς με AD συνήθως ζουν για περίπου 8 χρόνια μετά την αρχική τους διάγνωση (Q. Liu et al., 2007). Οι ηλικιακές ομάδες 65 έως 74 ετών, 75 έως 84 ετών και άνω των 85 ετών έχουν αντίστοιχα 3%, 18,7% και 47,2% επικράτηση της AD (Markesbery, 1997). Οι περιοχές του εγκεφάλου που ελέγχουν τη σκέψη και τη μνήμη αρχικά εξασθενούν ενώ καθώς η ασθένεια επιδεινώνεται, οι νευρώνες επηρεάζονται επίσης (Q. Liu et al., 2007).



Εικόνα 1: Εκτιμώμενη διάρκεια ζωής συγκριτικά με το φύλο και την ηλικία (Maslow, 2010).

Ανάλογα με το στάδιο που βρίσκεται η νόσος χαρακτηρίζεται και από παράγοντες που οδηγούν στην εξασθένηση διαφόρων λειτουργιών του εγκεφάλου και επηρεάζοντας την καθημερινότητα των ασθενών, η νόσος Alzheimer's χωρίζεται σε τρία στάδια:

1. Προκλινική νόσος Alzheimer's
2. Ήπια νοητική διαταραχή (Mild Cognitive Impairment)
3. Άνοια λόγω Alzheimer's (AD) (Maccora, Peters, & Anstey, 2020).

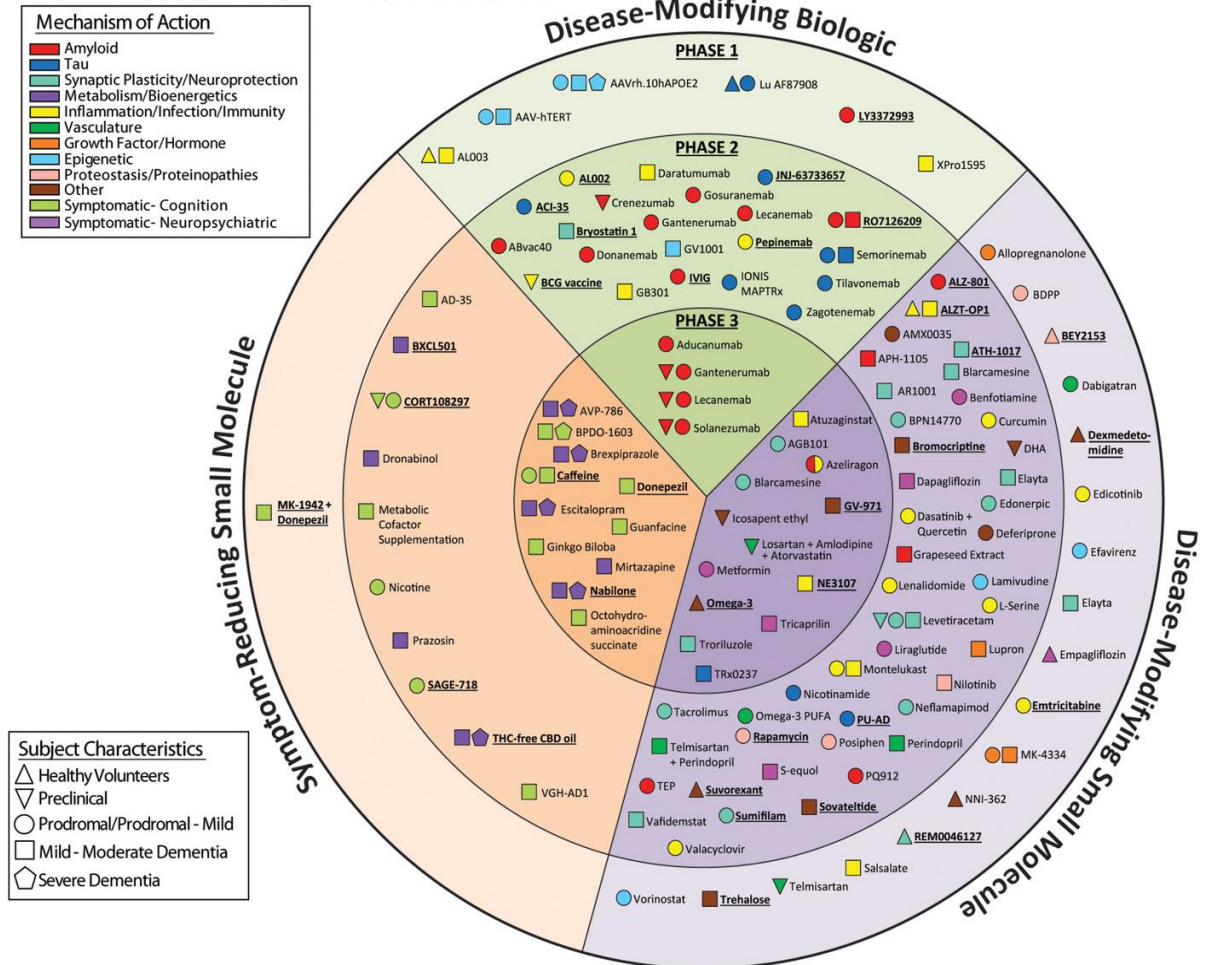


Εικόνα 2: Στάδια στη συνέχεια της νόσου του Αλτσχάιμερ (Porsteinsson, Isaacson, Knox, Sabbagh, & Rubino, 2021).

Η διαταραχή του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, το οξειδωτικό στρες, η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, η νευροφλεγμονή και ο υπομεταβολισμός είναι τα χαρακτηριστικά αυτής της ασθένειας. Η συσσώρευση αμυλοειδούς-πεπτιδίου, η υπερφωσφορυλίωση tau, η πτώση των επιπέδων ακετυλοχολίνης και η μειωμένη εγκεφαλική ροή αίματος συνδέονται όλα με την νόσο. Η άσκηση, η ψυχική διέγερση, η κοινωνική αλληλεπίδραση και η υγιεινή διατροφή είναι παραδείγματα παρεμβάσεων στον τρόπο ζωής που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μη φαρμακολογικές στρατηγικές πρόληψης AD. Ωστόσο, υπάρχουν δύο τύποι φαρμακευτικών θεραπειών για AD: οι συμπτωματικές θεραπείες και φάρμακα με βάση την αιτιολογία (Mendiola-Precoma, Berumen, Padilla, & Garcia-Alcocer, 2016). Η έγκαιρη διάγνωση και η χρήση διαφόρων μορφών θεραπείας είναι οι ακρογωνιαίοι λίθοι της αποτελεσματικής θεραπείας της νόσου του Αλτσχάιμερ. Παρόλο που δεν υπάρχουν αναγνωρισμένες διαδικασίες για τη διάγνωση της AD, η τρέχουσα διάγνωση βασίζεται κυρίως στην αξιολόγηση της συμπεριφοράς και της γνωστικής κατάστασης των ασθενών (Rajasekhar & Govindaraju, 2018).

Λόγω έλλειψης θεραπείας για την πάθηση, οι επιστήμονες ενδιαφέρονται πλέον για τη δημιουργία νέων φαρμάκων που θα είναι πιο αποτελεσματικά στη θεραπεία της νόσου και θα παράγουν καλύτερα αποτελέσματα. Προς το παρόν δεν υπάρχει θεραπεία για τη νόσο του Αλτσχάιμερ που να είναι αποτελεσματική. Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται τώρα μπορούν να μειώσουν τα συμπτώματα της νόσου, αλλά δεν μπορούν να σταματήσουν ή να επιβραδύνουν την εξέλιξή της. Σύμφωνα με το FDA, οι αναστολείς χολινεστεράσης (CIs) και οι ανταγωνιστές υποδοχέα NMDA (ανταγωνιστές υποδοχέα N-μεθυλ- \ddot{u} -ασπαρτικού) είναι οι μόνοι που έχουν εγκριθεί επί του παρόντος (Auld, Kornecook, Bastianetto, & Quirion, 2002).

2021 Alzheimer's Drug Development Pipeline



Εικόνα 3: Παράγοντες σε κλινικές δοκιμές για τη θεραπεία της νόσου Αλτσχάιμερ το 2021 (J. Cummings, Lee, Zhong, Fonseca, & Taghva, 2021).

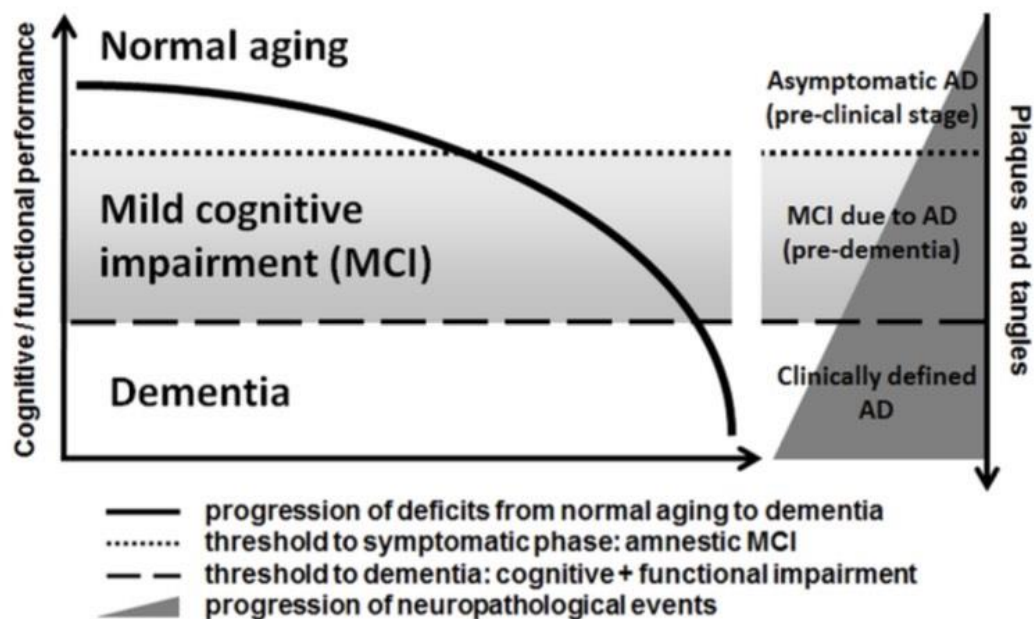
Οι μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν τις θεραπευτικές επιδράσεις των φυσικών προϊόντων, οι οποίοι βασίζονται κυρίως στην επίδραση των φυτοθεραπευτικών συστατικών σε διαφορετικές οδούς σηματοδότησης, έχουν προκαλέσει ενδιαφέρον για πολυάριθμες μελέτες ως μέσο επιβράδυνσης της νόσου. Επιπλέον, ο μηχανισμός που υποκρύπτει τη νευροπροστατευτική δραστηριότητα επιδιώκει να αυξήσει την έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων και να μειώσει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην απόπτωση (Essa et al., 2012). Η ανάπτυξη συμπληρωμάτων διατροφής που θα βοηθήσουν στην αποκατάσταση της γνωστικής εξασθένησης βασίζεται στην παρουσία αλκαλοειδών, φλαβονοειδών, καροτενοειδών και άλλων φυτοθεραπευτικών συστατικών σε φυσικά προϊόντα καθώς και στις ευεργετικές βιταμίνες που περιέχουν (Essa et al., 2012) (Noori, Dehpour, Sureda, Sobarzo-Sanchez, & Shirooie, 2021).

1.1 ΝΟΣΟΣ ALZHEIMER'S

1.1.1 ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ

Κλινικές ενδείξεις απώλειας μνήμης, εξασθένησης σε τουλάχιστον έναν γνωστικό τομέα και ενδείξεις κακής κοινωνικής ή επαγγελματικής λειτουργίας είναι απαραίτητες για τη διάγνωση της AD. Παρά όλες τις γνωστές θεραπείες, το AD είναι πολύ προοδευτικό (Castellani, Rolston, & Smith, 2010). Η κατάσταση μπορεί να συνεχιστεί έως και 20 χρόνια, οι ασθενείς με AD συνήθως ζουν για περίπου 8 χρόνια μετά την αρχική τους διάγνωση (Q. Liu et al., 2007). Η προσωρινή εξασθένηση της μνήμης αρχικά εκδηλώνεται ως απραξία, παρατυπίες ομιλίας, αποπροσανατολισμό και μειωμένη κρίση κατά τη διάρκεια μηνών και ετών. Με την πάροδο του χρόνου, οι ασθενείς χάνουν την ικανότητα να φροντίζουν τον εαυτό τους και συχνά περνούν τους τελευταίους μήνες ή χρόνια ως κατάκοιτοι (Castellani, Rolston, & Smith, 2010).

Η κατανόηση του προκλινικού σταδίου της AD και των μεταβλητών που προβλέπουν την εμφάνιση κλινικών δυσλειτουργιών καθώς και την εξέλιξή τους σε άνοια AD είναι ζωτικής σημασίας. Κατά συνέπεια, είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός του προφίλ βιοδεικτών που θα συμβάλλουν ώστε να εντοπιστούν τα συγκεκριμένα άτομα που θα επωφεληθούν περισσότερο από την έγκαιρη παρέμβαση (Maccora, Peters, & Anstey, 2020). Η νέα νοσολογική οντότητα, MCI, στην οποία οι ασθενείς φαίνεται να έχουν γνωστική εξασθένηση αλλά δεν έχουν ακόμη άνοια, αντικατοπτρίζει μια προσπάθεια βελτίωσης των πρώιμων διαγνωστικών κριτηρίων της AD. Ένας ασθενής με MCI μπορεί να αναπτύξει νευροεκφυλιστική νόσο, να παραμείνει κλινικά σταθερός για χρόνια ή ακόμα και να βελτιωθεί με το χρόνο. Ωστόσο, το MCI στερείται κληρονομικής βάσης, παθολογικού υποστρώματος και ειδικών θεραπευτικών οφελών. Ως αποτέλεσμα, ένα δεδομένο MCI μπορεί ή όχι να είναι μια πρόιμη περίπτωση AD, δίνοντας την εμφάνιση ότι το MCI είναι ένα στάδιο μεταξύ της κανονικής γήρανσης και μιας διάγνωσης AD (Castellani, Rolston, & Smith, 2010).



Εικόνα 4: Σχέση μεταξύ της εξέλιξης των γνωστικών και λειτουργικών συμπτωμάτων και των νευροπαθολογικών συμβάντων κατά την μετάβαση από την ασυμπτωματική νόσο Alzheimer's (AD) σε ήπια γνωστική εξασθένηση λόγω AD και κλινικά έκδηλη άνοια τύπου AD (Forlenza, Diniz, & Gattaz, 2010).

1.1.2 ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

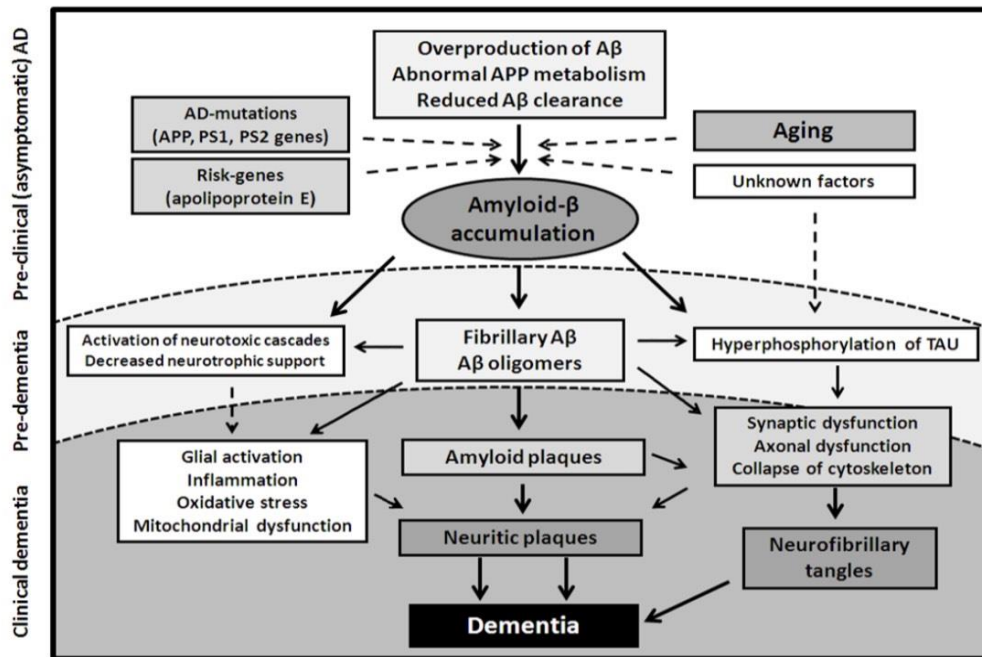
Η ασθένεια μπορεί να εκδηλωθεί ως αλλαγμένα ή κατεστραμμένα νευρικά κύτταρα (νευρώνες), τα οποία εμπλέκονται στη μνήμη, τη μάθηση και τη σκέψη. Η απώλεια πυραμιδικών νευρώνων ή δεικτών νευρικής σύνδεσης, συμπεριλαμβανομένων των απωλειών συνάψεων ή των νευριτικών αλλοιώσεων, φαίνεται να συσχετίζεται καλύτερα με την επιδείνωση της γνωστικής απόδοσης (Castellani, Rolston, & Smith, 2010). Η παραγωγή πλακών Αβ και νευροϊνιδιακών μπερδεμάτων (NFT), που μπορεί να παρατηρηθεί με μεθόδους χρώσης αργύρου, είναι δύο χαρακτηριστικές ανωμαλίες που ανιχνεύονται στους εγκεφάλους ασθενών με AD. Οι πρόδρομες πρωτεΐνες Α και αμυλοειδούς (APP), tau και νευροϊνιδιακές πρωτεΐνες βρίσκονται στην περιφερειακή περιοχή των γεροντικών πλακών (Q. Liu et al., 2007). Η συσσώρευση αμυλοειδούς -β (Αβ) και πρωτεΐνης tau συσσωματωμένη σε ενδοκυτταρικά νευροϊνιδιακά μπερδέματα (NFT) είναι τα χαρακτηριστικά

νευροπαθολογικά χαρακτηριστικά και των δύο τύπων AD (Mendiola-Precoma, Berumen, Padilla, & Garcia-Alcocer, 2016). Αυτές οι ανωμαλίες μπορεί να οδηγήσουν σε νευροτοξικές επικαλύψεις και να μεταβάλλουν τον κυτταροσκελετό, γεγονός που μπορεί τελικά να οδηγήσει σε νευρωνική δυσλειτουργία και θάνατο (Forlenza, Diniz, & Gattaz, 2010).

Η β-σεκρετάση και η Γ-σεκρετάση συνεργάζονται για να διασπάσουν διαδοχικά την πρόδρομη πρωτεΐνη β-αμυλοειδούς (APP) από την οποία δημιουργείται το πεπτιδίο Αβ (Long & Holtzman, 2019). Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη θεραπειών AD έχει δώσει μεγάλη έμφαση στη διαμόρφωση αυτών των ενζύμων ώστε να εμποδίσουν τη σύνθεση Αβ (Cao, Hou, Ping, & Cai, 2018). Ο εγκέφαλος AD παρουσιάζει ολιγομερή υψηλότερης τάξης, πρωτοϊνίδια και ινίδια κατασκευασμένα από πεπτιδία Αβ που είναι επιρρεπή σε συσσωμάτωση σε διαμορφώσεις φύλλων Β. (Long & Holtzman, 2019). Η πρόιμη έναρξη της AD προκαλείται από την υπερέκφραση της εφαρμογής του πεπτιδίου Αβ στους ανθρώπους, είτε μέσω της τρισωμίας του γονιδίου είτε της αναπαραγωγής γονιδίων στο χρωμόσωμα 21. Η πρόιμη έναρξη της AD προκαλείται από αυτοσωμικές κυρίαρχες μεταλλάξεις στο APP, PS1 ή PS2 (σχηματίζουν το σύμπλεγμα Γ-σεκρετάσης) που αλλάζουν τη δημιουργία ή την αυτοσυγκράτηση του Αβ και ενθαρρύνουν τη συσσωμάτωση και τη συσσώρευσή του στον εγκέφαλο (Huang & Mucke, 2012). Επομένως, η σκανδάλη για την ανάπτυξη της AD είναι οι αλλαγές στον ρυθμό σύνθεσης και κάθαρσης των πρωτεϊνών Αβ42 και των σχετικών πρωτεϊνών Αβ. Ως εκ τούτου, μπορεί να ειπωθεί ότι η παθοφυσιολογία της AD προκαλείται από την παραγωγή αδιάλυτων Αβ πεπτιδίων ως αποτέλεσμα της αποικοδόμησης της APP (Guimarães, Singla, & Zengin, 2022).

Η κυρίαρχη ενδοκυτταρική συσσωμάτωση πρωτεϊνών στους εγκεφάλους AD ονομάζεται NFT. Βρίσκονται κυρίως στις μετωπικές περιοχές, στον υπόκαμπο και στους μεγάλους πυραμιδικούς νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού (Q. Liu et al., 2007). Δέσμες ζευγαρωμένων ελικοειδών νημάτων (PHF), που αποτελούν NFT, παράγονται κυρίως από την πρωτεΐνη tau που σχετίζεται με μικροσωληνίσκους (Castellani, Rolston, & Smith, 2010). Το Tau είναι ασυνήθιστα υπερφωσφορικό, οξειδωμένο και συσσωματωποιημένο στις PHF. Πιστεύεται ότι η υπερφωσφορυλίωση tau δυσχεραίνει την δέσμευση του σε μικροσωληνίσκους, γεγονός που εμποδίζει την προώθηση ή την διατήρηση συναρμολόγησης μικροσωληνίσκων.

Ως αποτέλεσμα, μπορεί να είναι ζωτικής σημασίας για τον νευροϊνδιακό εκφυλισμό που παρατηρείται σε ασθενείς με AD (Q. Liu et al., 2007).

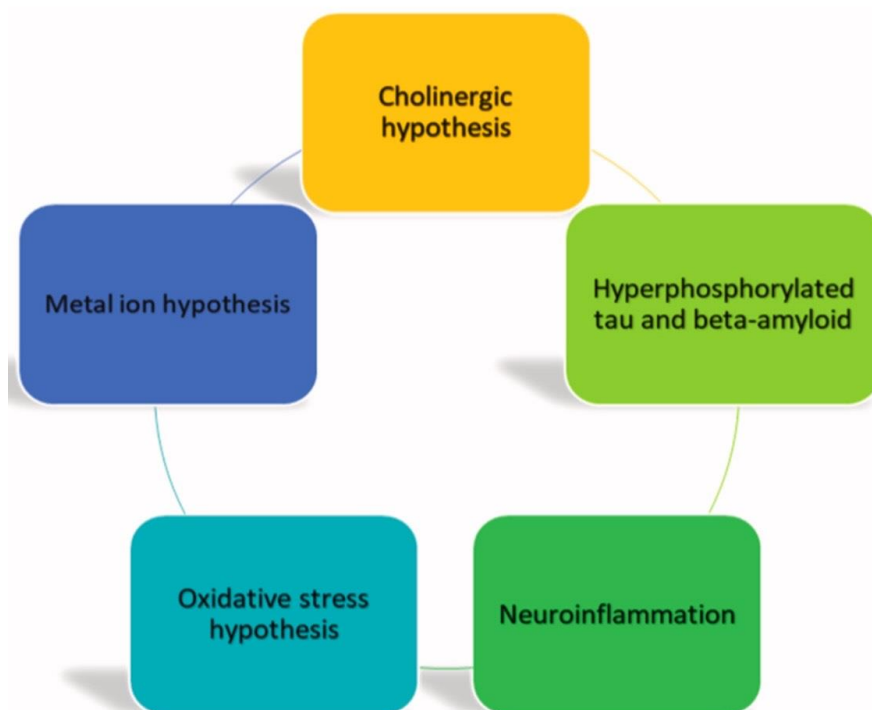


Εικόνα 5: Υποθετικό μοντέλο των παθολογικών διεργασιών στη νόσο Alzheimer (AD), εστιάζοντας στο πεπτίδιο αμυλοειδούς β (Aβ) (Forlenza, Diniz, & Gattaz, 2010).

Ένα από τα βασικά στοιχεία της αιτιολογίας της AD είναι η φλεγμονή. Μόλις ξεκινήσει η φλεγμονή και η νευρική βλάβη, μπορεί να παραχθούν πρόσθετες ουσίες γνωστές ως επικίνδυνα μοριακά πρότυπα (DAMPs), τα οποία πυροδοτούν μια σταθερή ανοσοαπόκριση που διαρκεί για μεγάλο χρονικό διάστημα στον εγκέφαλο. Αυτή η νευροφλεγμονή μπορεί να προκύψει ή να προκληθεί από πλάκες αμυλοειδούς και NFT. Η γενετική, η παχυσαρκία, ο καθιστικός τρόπος ζωής και ο διαβήτης συμβάλλουν στη χρόνια προφλεγμονώδη νόσο, η οποία επιδεινώνεται από συστηματικές λοιμώξεις (Noori, Dehpour, Sureda, Sobarzo-Sanchez, & Shirooie, 2021). Τα μικρογλοία, ανοσοκύτταρα που λειτουργούν για την εξάλειψη τοξικών πρωτεϊνών, νεκρών και κατεστραμμένων κυττάρων από τον εγκέφαλο, πιστεύεται ότι ενεργοποιούνται όταν υπάρχουν πρωτεΐνες β-αμυλοειδούς και tau (Guimarães, Singla, & Zengin, 2022). Δημιουργώντας προφλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως ιντερλευκίνες, TNF-α και γ-ιντερφερόνη, οι οποίες βλάπτουν το κεντρικό νευρικό σύστημα και

βρίσκονται σε άτομα με AD, η υπερέκφραση μικρογλοιακών κυττάρων και αστροκυττάρων προκαλεί παρατεταμένη και επαναλαμβανόμενη νευροφλεγμονή (Barage & Sonawane, 2015). Η χρόνια φλεγμονή μπορεί να αναπτυχθεί εάν τα μικρογλοία του εγκεφάλου δεν μπορούν να τα αφαιρέσουν πλήρως (Guimarães, Singla, & Zengin, 2022). Έτσι, τα μικρογλοία εκτίθενται και εκπέμπουν κυτταροτοξικές κυτοκίνες ως αποτέλεσμα της χρόνιας φλεγμονής, η οποία προκαλεί θάνατο και νευρική βλάβη. Στη συνέχεια, ακολουθούν η γνωστική παρακμή και τα συμπτώματα της AD.

Η χολινεργική υπόθεση, από την άλλη πλευρά, βασίζεται στη μείωση των χολινεργικών λειτουργιών σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου, συμπεριλαμβανομένου του φλοιού και του ιππόκαμπου, ως αποτέλεσμα της συσχέτισής της με τη σοβαρότητα του AD. Λόγω της αλλαγμένης δραστηριότητας ακετυλοτρανσφεράσης χολίνης και ακετυλοχολινεστεράσης, μειωμένα χολινεργικά συστήματα έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς με AD. Αυτό είχε σαν επακόλουθο την μείωση των επιπέδων ακετυλοχολίνης και την αλλοίωση των επιπέδων νικοτινικού και μουσκαρινικού υποδοχέα στον εγκέφαλο (Noori, Dehpour, Sureda, Sobarzo-Sanchez, & Shirooie, 2021).



Εικόνα 6: Υπόθεση για την παθοφυσιολογία της νόσου του Αλτσχάιμερ (Noori, Dehpour, Sureda, Sobarzo-Sanchez, & Shirooie, 2021).

1.1.2.1 TAU PROTEIN

Το tau, το οποίο είναι σχετικά άφθονο στους νευρώνες, εξυπηρετεί έναν τυπικό σκοπό στη σύνδεση με μικροσωληνίσκους και στη σταθεροποίηση της σύνδεσης μικροσωληνίσκων για πολυμερισμό. Η ανάγκη ενίσχυσης του φωσφορυλιωμένου tau στον ηλικιωμένο εγκέφαλο για την επιτυχή θεραπεία του AD προέκυψε από την ανακάλυψη ότι το φωσφορυλιωμένο tau είναι ένα επιβλαβές και απαραίτητο πρωτεϊνικό συστατικό της εγκεφαλικής βλάβης του NFT. Σε υγιή κύτταρα, το φωσφορυλιωμένο tau καταλαμβάνει συνήθως μεγάλο χώρο με την πάροδο του χρόνου.

Η αυξημένη φωσφορυλίωση του tau σχετίζεται με το AD επειδή μπορεί, σε συνδυασμό με άλλες μεταβλητές (Αβ, οξειδωτικό στρες, φλεγμονώδεις μεσολαβητές), να προκαλέσει τον διαχωρισμό του από τον μικροσωληνίσκο και την απομόνωση του σε NFT (Castellani, Rolston, & Smith, 2010). Οι μικροσωληνίσκοι μεταβάλλονται σοβαρά και παραμορφώνονται από το υπερφωσφορυλιωμένο tau, το οποίο τελικά προκαλεί το θάνατο των νευρικών κυττάρων αλλά επίσης αυξάνει και τη σύνθεση του Αβ (Harald Hampel et al., 2018). Η αξονική μεταφορά παρεμποδίζεται και ο συναπτικός εκφυλισμός επιταχύνεται από την πιθανή τοξικότητα και την έλλειψη φυσιολογικής λειτουργίας του Tau, η οποία είναι γνωστό ότι βοηθά στη σταθεροποίηση και τη διατήρηση των μικροσωληνίσκων (Castellani, Rolston, & Smith, 2010).

1.1.2.2 ΧΟΛΙΝΕΡΓΙΚΗ ΥΠΟΘΕΣΗ

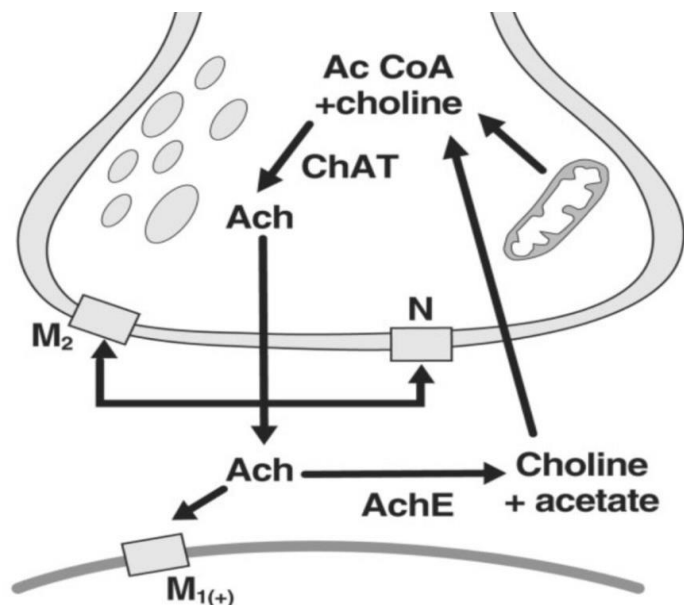
Είναι από καιρό γνωστό ότι η χολινεργική δυσλειτουργία παίζει σημαντικό ρόλο στα νευροψυχιατρικά συμπτώματα της AD. Στον κροταφικό λοβό, τους μετωπιαίους και βρεγματικούς φλοιούς του εγκέφαλου AD, η δραστηριότητα των επιπέδων της ακετυλοτρανσφεράσης χολίνης ChAT (από 30 έως 90%) και του ChAT mRNA (περίπου 50%) ήταν ιδιαίτερα σημαντική (Auld, Kornecook, Bastianetto, & Quirion, 2002). Με δραστηριότητα στον φλοιό, τα βασικά γάγγλια και τον πρόσθιο εγκέφαλο, η ακετυλοχολίνη (ACH) είναι ένας κρίσιμος νευροδιαβιβαστής στον εγκέφαλο (Hampel, Mesulam, Cuello, Khachaturian, et al., 2018). Γενικά, η μείωση

του αριθμού των χολινεργικών νευρώνων NBM, ειδικά εντός των υποτομέων Ch4, συνδέεται με την απώλεια δραστηριότητας της ακετυλοτρανσφεράσης χολίνης ChAT, του ενζύμου που συνθέτει ACh. Πολλές έρευνες έχουν δείξει μια σημαντική, αρνητική σχέση μεταξύ της δραστηριότητας ChAT και της πυκνότητας των γεροντικών πλακών σε πολλές φλοιώδεις περιοχές των εγκεφάλων AD. Επιπλέον, υπάρχει μια μικρή συσχέτιση μεταξύ της πυκνότητας του νευροϊνιδιακού μπερδέματος και των επιπέδων ChAT, ενώ μια άλλη μελέτη απέδειξε μια ισχυρή σύνδεση μεταξύ των δύο σε πολλές φλοιώδεις περιοχές του εγκεφάλου AD (Auld, Kornecook, Bastianetto, & Quirion, 2002).

Ο εκφυλισμός των χολινεργικών νευρώνων NBM συνδέεται με χολινεργική απώλεια. Οι νικοτινικοί (ιονοτροπικοί) και μουσκαρινικοί (μεταβοτροπικοί) υποδοχείς του εγκεφαλικού φλοιού εμφανίζουν επίσης αλλοιώσεις ως αποτέλεσμα χολινεργικού τραυματισμού. Έτσι, μια προοδευτική απώλεια των βασικών χολινεργικών νευρώνων αντιπροσωπεύει ένα βασικό νευροχημικό συμβάν με επακόλουθο χολινεργική απομάκρυνση του πρόσθιο φλοιώδες, του εγκεφαλικού φλοιού, του ιππόκαμπου και της αμυγδαλή (Harald Hampel et al., 2018). Πολυάριθμες μεταθανάτιες μελέτες αποκάλυψαν συσχέτιση μεταξύ της μείωσης της δραστηριότητας ChAT και του νευρωνικού θανάτου στο NBM-Ch4 με το βαθμό άνοιας, όπως καθορίζεται από νευροψυχολογικές εξετάσεις (Auld, Kornecook, Bastianetto, & Quirion, 2002).

Η χολινεργική βλάβη που προκαλείται από τη νόσο του Alzheimer's μπορεί έτσι να επηρεάσει μια ποικιλία πτυχών της νευροπλαστικότητας καθώς και τις αιμοδυναμικές διεργασίες του εγκεφάλου με εξαίρεση την παρεμπόδιση της συναπτικής μετάδοσης στον φλοιό και τις μεταιχμιακές περιοχές (Harald Hampel et al., 2018). Το παραπάνω σώμα ιδεών αποδεικνύει ότι η παρακμή των μηχανισμών ενός συστήματος που θεωρείται θεμελιώδες για τη μνήμη, έγινε κατ'επέκταση η απλοποιημένη" χολινεργική υπόθεση της νόσου του Αλτσχάιμερ " και ήταν κατανοητό ως μια από τις βασικές αιτίες της νόσου (Hampel, Mesulam, Cuello, Khachaturian, et al., 2018). Συνολικά, ο χολινεργικός νευροεκφυλισμός δεν έχει τεκμηριωθεί επαρκώς ως ο κύριος λειτουργικός προγνωστικός παράγοντας των γνωστικών συμπτωμάτων που παρατηρούνται στην AD, παρά τις μεταθανάτιες μελέτες που υποδηλώνουν ότι αποτελεί σημαντική πτυχή της νευροπαθολογίας της νόσου (Auld, Kornecook, Bastianetto, & Quirion, 2002). Παρ ' όλα αυτά, οι αναστολείς χολινεστεράσης (ChEIs) εξακολουθούν να είναι τα κύρια φάρμακα που

έχουν εγκριθεί για τη θεραπεία γνωστικών προβλημάτων στο AD. Επί του παρόντος, η donepezίλη, η ριβαστιγμίνη και η γαλανταμίνη είναι τρία φάρμακα που έχουν αντίκτυπο στη χολινεργική υπόθεση και χρησιμοποιούνται συχνά ως πρότυπο φροντίδας για τη φαρμακολογική θεραπεία του κλινικού συμπτωματικού σταδίου της AD (Hampel, Mesulam, Cuello, Khachaturian, et al., 2018).



Εικόνα 7: Φυσιολογία της χολινεργικής σύναψης (Harald Hampel et al., 2018).

*Η χολίνη είναι το κρίσιμο υπόστρωμα για τη σύνθεση της ακετυλοχολίνης. Ακετυλο συνένζυμο Α (AcCoA) μαζί με το ένζυμο ακετυλοτρανσφεράση χολίνης (ChAT) είναι κρίσιμα για τη σύνθεση της ακετυλοχολίνης (ACh). Μόλις ο νευροδιαβιβαστής ακετυλοχολίνη απελευθερωθεί στη σύναψη, δεσμεύει (ενεργοποιεί) μετασυναπτικό υποδοχέα (M_1), μεταδίδοντας έτσι ένα σήμα από έναν νευρώνα σε άλλο. Η περίσσεια νευροδιαβιβαστή στη συναπτική σχισμή διασπάται από το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση (AChE) σε χολίνη και οξικό άλας, τα οποία επιστρέφονται από έναν μηχανισμό πρόσληψης για ανακύκλωση σε ακετυλο συνένζυμο Α

1.2 ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

1.2.1 ΗΛΙΚΙΑ

Ο μεγαλύτερος παράγοντας κινδύνου στην αιτιολογία της AD είναι η ηλικία. Το 10-15% των ατόμων άνω των 65 ετών και έως 47% των ατόμων άνω των 80 ετών επηρεάζονται από το AD (Q. Liu et al., 2007). Η γήρανση είναι η κύρια αιτία της AD, ανεξάρτητα από το αν κάποιος είναι γενετικά επιρρεπής σε αυτήν ή όχι. Αυτή η συσχέτιση της νόσου με την ηλικία αποτελεί παράγοντα κινδύνου και για άλλες νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως ο καρκίνος, η αθηροσκλήρωση, η αρθρίτιδα και το εμφύσημα. Σε σύγκριση με τους ασθενείς που παρουσιάζουν απώλεια μνήμης κατά την ένατη ή δέκατη δεκαετία με ταυτόχρονη αθηροσκληρωτική νόσο και τη συγχυτική επίδραση μυριάδων ασθενειών, τις επιπλοκές τους και έναν μακρύ κατάλογο φαρμάκων, οι νεότεροι ασθενείς που έχουν προσβληθεί από την έκτη δεκαετία χωρίς οικογενειακό ιστορικό έχουν μεγαλύτερη σημασία για την παθολογία AD (Castellani, Rolston, & Smith, 2010). Τα φάρμακα που σταθεροποιούν τα επίπεδα ακετυλοχολίνης στους νευρώνες χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της πάθησης, η οποία προκαλείται από μειώσεις των χολινεργικών νευρώνων που σχετίζονται με τη γήρανση (Q. Liu et al., 2007).

1.2.2 ΧΑΜΗΛΟ ΕΠΙΠΕΔΟ ΜΟΡΦΩΣΗΣ

Ανεπίσημα, η χαμηλή εκπαίδευση θεωρείται σημαντικός παράγοντας κινδύνου για άνοια σε ολόκληρο τον κόσμο, ο οποίος όμως μπορεί να τροποποιηθεί. Η πιθανότητα ενός ατόμου να εμφανίσει την νόσο κάποια στιγμή στη ζωή του είναι σημαντικά υψηλότερη για όσους δυσκολεύονται με την ανάγνωση και τη γραφή λόγω έλλειψης εκπαίδευσης. Σύμφωνα με έρευνες, η ανάγνωση μπορεί να καθυστερήσει ή ακόμα και να σταματήσει την έναρξη της νόσου. Οι άνθρωποι που έχουν κατακτήσει αυτές τις δεξιότητες στο παρελθόν είναι σε θέση να συμμετέχουν σε περισσότερες δραστηριότητες ενεργοποίησης του εγκεφάλου. Τέτοιες δραστηριότητες διεγείρουν τον εγκέφαλο και ενισχύουν την συνδεσιμότητα μεταξύ των κυττάρων αποτρέποντας την εμφάνιση άνοιας (Maccora, Peters, & Anstey, 2020).

1.2.3 ΔΙΑΒΗΤΗΣ

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μεταβολική ασθένεια που χαρακτηρίζεται από αύξηση της συγκέντρωσης σακχάρου στο αίμα και διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης. Κύριοι τύποι σακχάρου είναι ο διαβήτης τύπου 1, ο διαβήτης τύπου 2 και ο διαβήτης κύησης. Πρωτεύοντα ρόλο στη θεραπεία του διαβήτη παίζει ρόλο η χορήγηση ινσουλίνης στον ασθενή. Η ύπαρξη σακχαρώδη διαβήτη οπουδήποτε τύπου διπλασιάζει τις πιθανότητες εμφάνισης άνοιας σε όλες τις ηλικίες ακόμα και σε νέους ενήλικες. Ο αρρυθμιστος σακχαρώδης διαβήτης αλλά και οι υπογλυκαιμίες σε ευπαθείς ηλικίες αυξάνουν τον κίνδυνο άνοιας και κατά συνέπεια της νόσου Alzheimer's (McMillan, Mele, Hogan, & Leung, 2018) (Zimmet, Alberti, Magliano, & Bennett, 2016).

1.2.4 ΥΠΕΡΤΑΣΗ

Η Επιτροπή Lancet για την πρόληψη της άνοιας προσδιόρισε την υπέρταση μέσης ηλικίας ως βασικό παράγοντα κινδύνου για την άνοια και κατά συνέπεια για την εκδήλωση της νόσου Alzheimer's. Η υψηλή συχνότητα εμφάνισης καρδιακών παθήσεων σε όσους πάσχουν από υψηλή αρτηριακή πίεση επηρεάζει την ποσότητα του αίματος και θρεπτικών ουσιών στον εγκέφαλο με αποτέλεσμα της πιθανή εμφάνιση της νόσου. Ο έλεγχος της αρτηριακής πίεσης μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο άνοιας σε όλες τις περιπτώσεις και ειδικά στις κατηγορίες ασθενών με κληρονομική προδιάθεση για εμφάνιση της νόσου Alzheimer's (Carnevale, Perrotta, Lembo, & Trimarco, 2015).

1.2.5 ΓΟΝΙΔΙΟ APOE

Το ApoE εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα στο ήπαρ και τον εγκέφαλο. Είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που συντίθεται και εκκρίνεται κυρίως από αστροκύτταρα και μικρογλοία στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ). Το γονίδιο APOE έχει τρία κοινά αλληλόμορφα που κωδικοποιούν τρεις ισομορφές πρωτεϊνών ApoE2, ApoE3

και ApoE4. Το αλληλόμορφο E4 του ApoE ειδικότερα είναι ένας σημαντικός γενετικός παράγοντας κινδύνου για τον πιο διαδεδομένο τύπο εμφάνισης AD.

Η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου αυξάνεται κατά τρεις έως τέσσερις φορές με ένα μόνο κληρονομικό αντίγραφο του αλληλόμορφου APOE/E4 και δώδεκα φορές με δύο κληρονομικά αντίγραφα (Long & Holtzman, 2019). Το αλληλόμορφο E2 (APOE2) είναι η λιγότερο συχνή παραλλαγή και θεωρείται ότι μειώνει την πιθανότητα εμφάνισης της πάθησης, ενώ το αλληλόμορφο E3 (APOE3) είναι ο πιο διαδεδομένος πολυμορφισμός APOE στο γενικό πληθυσμό και θεωρείται ουδέτερος ως προς τον κίνδυνο (Altmann, Tian, Henderson, & Greicius, 2014).

Πολλαπλές οδοί φαίνεται να εμπλέκονται στον τρόπο με τον οποίο ο γονότυπος APOE επηρεάζει την AD. Οι πολυμορφισμοί είναι καθοριστικός παράγοντας της επιβάρυνσης του εγκεφάλου σε άτομα με AD. Οι απολιποπρωτεΐνες έχουν επίσης θεωρηθεί ότι λειτουργούν ως αντιοξειδωτικά. Το αλληλόμορφο ApoE4 είναι λιγότερο αποτελεσματικό σε αυτόν τον ρόλο, οδηγώντας σε υψηλότερη οξειδωτική βλάβη που εντοπίζεται σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου των ασθενών με AD που έχουν τον γονότυπο APOE4 (Q. Liu et al., 2007). Η AD επηρεάζει το 15-35% των συγγενών πρώτου βαθμού ασθενών με AD, οι οποίοι είναι πιο πιθανό να αναπτύξουν τη νόσο από τον γενικό πληθυσμό (Castellani, Rolston, & Smith, 2010). Οι πολυμορφισμοί γονιδίου APOE είναι οι κύριοι γενετικοί παράγοντες που συνδέονται με την ανάπτυξη της AD, με το 50% των ασθενών με AD να έχουν τουλάχιστον ένα αλληλόμορφο ApoE4 (Q. Liu et al., 2007).

1.2.6 ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ 21

Το κύριο στοιχείο των γεροντικών πλακών είναι μια πρωτεΐνη Αβ, η οποία παράγεται από την πρόδρομη πρωτεΐνη, ΑβPP. Η ΑβPP κωδικοποιείται στο χρωμόσωμα 21. Η λειτουργία ενός ΑβPP είναι άγνωστη, αλλά εμπλέκεται σε πολλές ευρείες φυσιολογικές λειτουργίες στους νευρώνες. Οι μεταλλάξεις στην ΑβPP οδηγούν σε μειώσεις στην Αβ, οι οποίες εμποδίζουν την εξωκυτταρική συσσωμάτωση πρωτεϊνών. Η μετάλλαξη αντιπροσωπεύει μόνο το 0,1-0,15% όλων των περιπτώσεων AD, το οποίο είναι ένα πολύ μικρό κλάσμα (Q. Liu et al., 2007).

1.2.7 ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ 14/ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ 1

Η presenilin 1 και presenilin 2 είναι δύο γονίδια που μεταλλάσσονται στην πλειονότητα των περιπτώσεων (περίπου 70%) της AD πρώιμης έναρξης. Αυτά τα γονίδια βρίσκονται στα χρωμοσώματα 14 και 1, αντίστοιχα. Μέχρι στιγμής έχουν εντοπιστεί περισσότερες από 30 ξεχωριστές επιβλαβείς μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια. Το σύμπλοκο Γ-σεκρετάσης, το οποίο απαιτείται για την παραγωγή πεπτιδίων Αβ, περιέχει πρεσενιλίνες. Οι μεταλλάξεις σε αυτές τις θέσεις σύμφωνα με πληροφορίες αλλάζουν τον τρόπο με τον οποίο διεξάγεται η επεξεργασία Αβ, οδηγώντας σε υπεραυξημένη σύνθεση και εναπόθεση ή σε υπεραπλούστευση (Castellani, Rolston, & Smith, 2010).

Οι φυσιολογικοί ρόλοι αυτών των δύο προσαγωγών είναι άγνωστοι, ωστόσο μπορεί να συνδέονται με το μονοπάτι του υποδοχέα Notch. Το κανάλι ιόντων, η επεξεργασία πρωτεϊνών ή οι δραστηριότητες μεταφοράς κυττάρων είναι πρόσθετοι δυνητικοί ρόλοι. Πιστεύεται ότι η AD προκαλείται από μεταλλάξεις σε αυτές τις πρωτεΐνες που παρεμβαίνουν στην επεξεργασία ενός ΑβPP (Q. Liu et al., 2007).

1.2.8 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Η παθοφυσιολογία της AD περιλαμβάνει μια σημαντική λειτουργία για το οξειδωτικό στρες. Τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες, οι υδατάνθρακες και το DNA των κυττάρων μπορεί να υποστούν βλάβη από το οξειδωτικό στρες. Το οξειδωτικό στρες προκύπτει από οποιαδήποτε ανισορροπία μεταξύ του σχηματισμού ελεύθερων ριζών και αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) εντός του κυττάρου και των αντιοξειδωτικών αμυντικών συστημάτων. Η ανισορροπία οξειδοαναγωγής που σχετίζεται με την ηλικία αντισταθμίζεται λιγότερο εύκολα από τους νευρώνες. Η αιτιολογία των νευροεκφυλιστικών ασθενειών επηρεάζεται ακόμη και από οι μικρές κυτταρικές καταπονήσεις επειδή έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν ανεπανόρθωτη βλάβη. Οι ROS, συμπεριλαμβανομένων των ελεύθερων ριζών, είναι οι βασικοί παράγοντες οξειδωτικού τραυματισμού που βλάπτουν τα λιπίδια, τους υδατάνθρακες, το DNA/RNA και τις πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων (Q. Liu et al., 2007).

1.2.9 ΚΕΚ (Κρανιοεγκεφαλική Κάκωση)

Η κρανιοεγκεφαλική κάκωση (ΚΕΚ) αφορά τον τραυματισμό του κεφαλιού λόγω κάποιου ατυχήματος. Οι ΚΕΚ σχετίζονται με κίνδυνο εμφάνισης άνοιας ακόμα και σε μεσήλικα άτομα, με όσο μεγαλύτερη κάκωση τόσο μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Λόγω της χρόνιας φλεγμονής που δημιουργείται στον εγκέφαλο εξαιτίας του χτυπήματος ο κίνδυνος άνοιας παραμένει υψηλός ακόμα και για πολλά χρόνια μετά το χτύπημα. Επίσης, πολλαπλές κακώσεις αποτελούν εξίσου σημαντικό κίνδυνο εμφάνισης άνοιας με διαφορετικά χαρακτηριστικά (Graham & Sharp, 2019) (Mendez, 2017).

1.2.10 ΚΑΠΝΙΣΜΑ

Το κάπνισμα αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου AD. Οι άνθρωποι που καπνίζουν έχουν τρεις φορές μεγαλύτερο κίνδυνο για άνοια σε σύγκριση με τους μη καπνίζοντες. Προκαλεί αγγειακά προβλήματα που μπορούν να οδηγήσουν σε αγγειοπάθεια, εγκεφαλικό επεισόδιο και στεφανιαία νόσο. Επίσης, αυξάνει την ομοκυστεΐνη και το οξειδωτικό στρες, βασικές αιτίες προβλημάτων μνήμης. Ο καπνός του τσιγάρου περιέχει τοξικές ουσίες, όπως το μονοξείδιο του άνθρακα οι οποίες επηρεάζουν τις λειτουργίες των νευρώνων και την ροή του αίματος στον εγκέφαλο, με αποτέλεσμα οι νευρώνες να χάνουν τις συνάψεις τους, να μην είναι λειτουργικοί και να πεθαίνουν. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας το κάπνισμα αποτελεί τη κύρια αιτία στο 14% των ασθενών με νόσο Alzheimer's. Μάλιστα, οι καπνιστές έχουν 45% περισσότερες πιθανότητες να εμφανίσουν την νόσο σε σύγκριση με τους μη καπνιστές (G. Zhong, Wang, Zhang, Guo, & Zhao, 2015).

1.2.11 ΚΑΤΑΘΛΙΨΗ

Μια επικρατούσα ψυχική κατάσταση που έχει σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία σε ολόκληρο τον κόσμο είναι η κατάθλιψη. Επιπλέον, μία από τις πιο κοινές ψυχικές

ασθένειες στον ηλικιωμένο πληθυσμό είναι η κατάθλιψη. Παράλληλα, η συχνότητα εμφάνισης νευροεκφυλιστικών ασθενειών όπως η νόσος Alzheimer's αυξάνεται με την αύξηση της ηλικίας όπως και η κατάθλιψη (Baquero, 2015).

Η νευροφλεγμονή είναι μία από τις πιο συχνά αναγνωρισμένες διαδικασίες. Παρατηρείται τόσο σε νευροεκφυλιστικές διαταραχές όσο και στην κατάθλιψη. Επίσης, η οδός μονοαμινοξειδάσης είναι μια άλλη καλά ερευνημένη ιδέα. Η σεροτονίνη, η ντοπαμίνη και η νορεπινεφρίνη είναι μόνο μερικά παραδείγματα των νευροδιαβιβαστών μονοαμίνης, που λόγω δυσλειτουργίας τους, έχουν συνδεθεί με την παθογένεση αρκετών νευροεκφυλιστικών διαταραχών, όπως η νόσος του Πάρκινσον και η νόσος του Αλτσχάιμερ (Galts et al., 2019). Τα συμπτώματα των νευροεκφυλιστικών ασθενειών μπορεί να περιλαμβάνουν γνωστική παρακμή, απάθεια και ευερεθιστότητα, τα οποία παρατηρούνται συχνά και στην κατάθλιψη.

Η γνώση και η λειτουργία ενός εγκεφάλου που έχει ήδη εκφυλιστεί μειώνονται περαιτέρω όταν η κατάθλιψη και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες εμφανίζονται μαζί. Επομένως, οι ασθενείς με νευροεκφυλιστικές διαταραχές και κατάθλιψη έχουν φτωχότερη κλινική εικόνα από εκείνους που δεν έχουν κατάθλιψη. (Baquero, 2015).

1.2.12 ΑΛΛΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Η κατάχρηση αλκοόλης σχετίζεται με την δυσλειτουργία οργάνων όπως το ήπαρ και ο εγκέφαλος. Η κατάχρηση αλκοόλ προκαλεί διαταραχές στη λειτουργία του εγκεφάλου και επιταχύνει τον νευροεκφυλισμό μέσω φλεγμονωδών διεργασιών που εμπλέκουν άμεσα τα ανοσοκύτταρα (Ramos, Joshi, & Szabo, 2022). Οι νευροπαθολογικές αλλοιώσεις της AD εμφανίζονται σε ενήλικες με σύνδρομο Down μέχρι την ηλικία των 40 ετών, ωστόσο δεν είναι όλα τα άτομα ψυχικά άρρωστα. Οι οικογένειες με ιστορικό συνδρόμου Down έχουν 2-3 φορές περισσότερες πιθανότητες να αναπτύξουν AD(Q. Liu et al., 2007).

1.3 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Η παρεκκλίνουσα εναπόθεση πεπτιδίου αμυλοειδούς β (Aβ) και η ενδοκυτταρική συσσώρευση συμπλεγμάτων νευροϊνιδιακής υπερφωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης tau είναι δύο χαρακτηριστικά των ασθενών με AD. Μαζί με την πρωτεΐνη tau, το νευροτοξικό ολιγομερές πεπτίδιο AB, το οποίο είναι το νευροπαθολογικό διαγνωστικό κριτήριο της νόσου, είναι μεσολαβητές νευροεκφυλισμού και δύο από τους κύριους αιτιολογικούς παράγοντες της νόσου AD. Ωστόσο, το οξειδωτικό στρες, μια κατάσταση που χαρακτηρίζεται από ανισορροπία μεταξύ αντιοξειδωτικών και υπεροξειδωτικών, είναι κυρίως υπεύθυνη για την εμφάνιση και την επιδείνωση αυτών των προβλημάτων. Αυξημένα επίπεδα ελεύθερων ριζών ή μειωμένη αντιοξειδωτική άμυνα μπορεί να προκαλέσει αυτή την ανισορροπία (HUANG, ZHANG, & CHEN, 2016).

Τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS), όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το νιτρικό οξείδιο, το υπεροξείδιο και οι ρίζες υδροξυλίου, παράγονται ανεξέλεγκτα και οδηγούν σε οξειδωτικό στρες. Λόγω της υψηλής κατανάλωσης οξυγόνου, των φτωχών αντιοξειδωτικών επιπέδων, και της περιορισμένης δυνατότητας αναγέννησης, ο ιστός του εγκεφάλου είναι ευάλωτος στην οξειδωτική ζημία (Hung, Chen, Hsieh, Chiou, & Kao, 2010). Τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου(ROS), επίσης γνωστά ως ρίζες υδροξυλίου, δημιουργούνται όταν το υπεροξείδιο του υδρογόνου μειώνεται από τις ελεύθερες ρίζες. Τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα και άλλες χημικές ουσίες που είναι ζωτικής σημασίας για τη λειτουργία του εγκεφάλου μπορεί να ανταποκριθούν σε αυτό, αλλάζοντας τον τρόπο λειτουργίας τους και τον τρόπο δομής τους (Huang, Zhang, & Chen, 2016).

Τα άμεσα στοιχεία που υποστηρίζουν την αύξηση του οξειδωτικού στρες σε AD είναι:

1. τα αυξημένα επίπεδα Fe, Al και Hg στον εγκέφαλο, τα οποία μπορούν να διεγείρουν τη δημιουργία ελεύθερων ριζών,
2. η αυξημένη υπεροξειδωση των λιπιδίων, η μείωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στον εγκέφαλο των AD και η αυξημένη 4-hydroxynonenal, μια αλδεΐδη προϊόντων της λιπιδικής υπεροξειδωσης του κοιλιακού υγρού των AD,

3. ο μειωμένος ενεργειακός μεταβολισμός και η μειωμένη οξειδάση του κυτοχρώματος c στον εγκέφαλο AD,
4. η αυξημένη οξείδωση πρωτεϊνών και DNA στον εγκέφαλο AD,
5. τα τελικά προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (AGE), η μηλονική δι-αλδεϋδη, τα καρβονύλια, η υπεροξυνιτρίτης, η οξυγενάση-1 αίμης και SOD-1 σε νευροϊνιδιακά μπερδέματα, η αίμη οξυγενάσης-1 και SOD-1 σε γεροντικές πινακίδες,
6. το β-αμυλοειδές πεπτίδιο να είναι σε θέση να παράγει ελεύθερες ρίζες (Markesbery, 1997).

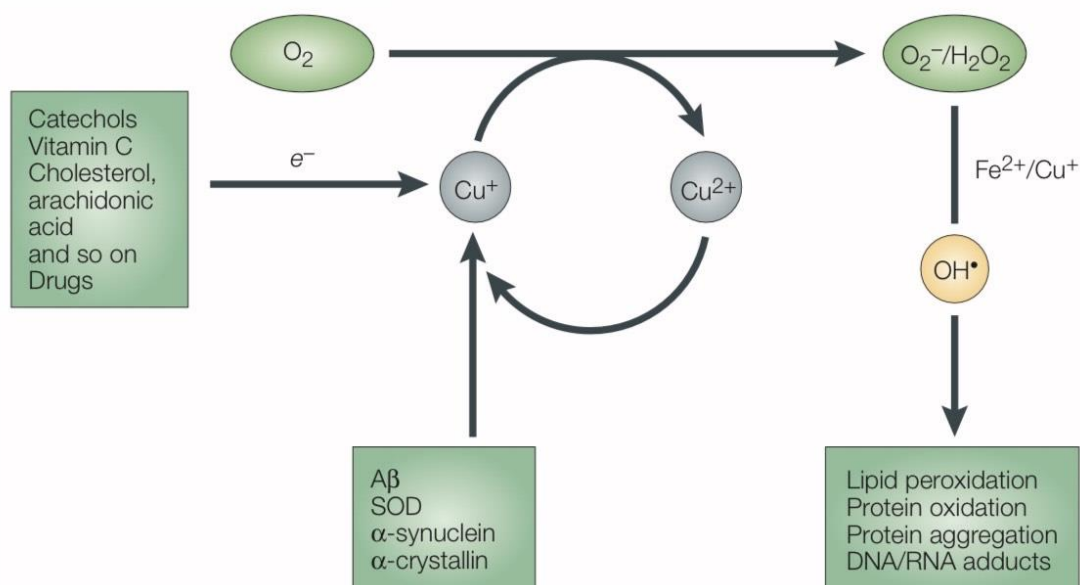
1.3.1 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ

Ένα είδος γνωστό ως ελεύθερη ρίζα έχει ένα ή περισσότερα μη ζευγαρωμένα ηλεκτρόνια στο εξωτερικό του κέλυφος. Η κύρια πηγή ισχυρών ελεύθερων ριζών είναι η μείωση του μοριακού οξυγόνου στο νερό. Αυτή η διαδικασία αρχικά οδηγεί στη ρίζα υπεροξειδίου, η οποία στη συνέχεια απελευθερώνει υπεροξειδίου του υδρογόνου όταν προστίθεται ένα ηλεκτρόνιο. Οι ρίζες υδροξυλίου, επίσης γνωστές ως αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS), δημιουργούνται όταν μειώνεται το υπεροξειδίου του υδρογόνου. Αυτό μπορεί να επηρεάσει τις δομές και τις λειτουργίες μορίων όπως λιπίδια, πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και άλλα μόρια μέσω αντιδράσεων με αυτά. Κατά συνέπεια, λόγω της σύνθεσής του, το ROS έχει αντίκτυπο στους ιστούς, τα όργανα και ιδιαίτερα στον εγκέφαλο. Ο εγκέφαλος εξάλλου αποτελείται σε μεγάλο βαθμό από εύκολα οξειδωσιμα λιπίδια ενώ διαθέτει υψηλό ρυθμό κατανάλωσης οξυγόνου (Huang, Zhang, & Chen, 2016).

Αναλυτικά, το μοριακό οξυγόνο έχει μόνο δύο απλά ηλεκτρόνια στο εξωτερικό του κέλυφος με αποτέλεσμα να μπορεί να αλληλεπιδράσει μόνο με ένα ηλεκτρόνιο κάθε φορά, γεγονός που δεν το καθιστά εξαιρετικά αντιδραστικό με τα ηλεκτρόνια σε έναν χημικό δεσμό. Τα ηλεκτρόνια έχουν αντίθετες περιστροφές και μπορούν να αντιδράσουν γρήγορα με άλλα ζεύγη ηλεκτρονίων, ειδικά με διπλούς δεσμούς. Το προκύπτον απλό οξυγόνο μετατρέπεται στη συνέχεια σε ισχυρό οξειδωτικό. Ένα ανιόν υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), ο πρόδρομος της πλειοψηφίας των ROS και ένας μεσολαβητής στην αλυσιδωτή αντίδραση του οξειδωτικού στρες,

δημιουργείται όταν το οξυγόνο μειώνεται από ένα ηλεκτρόνιο. Επιπλέον, τα αντιοξειδωτικά μετατρέπουν εν μέρει το $O_2^{\cdot-}$ στην ισχυρή ρίζα υδροξυλίου (OH^{\cdot}), ένα από τα πιο έντονα οξειδωτικά της φύσης. Τα μεταβατικά μέταλλα, τα οποία μπορεί επίσης να μειωθούν με $O_2^{\cdot-}$, επιταχύνουν αυτή τη διαδικασία. Επιπλέον, το $O_2^{\cdot-}$ αλληλεπιδρά επίσης με άλλες ρίζες όπως το NO και έχει ως αποτέλεσμα τη μορφή υπεροξυνιτρίτη, ένα πολύ ισχυρό οξειδωτικό που προκαλεί το λεγόμενο RNS (M. A. Smith, Rottkamp, Nunomura, Raina, & Perry, 2000).

Οι ROS ή / και RNS αποτελούν τους κύριους παράγοντες, οι οποίοι με την παρουσία περιορισμένης αντιοξειδωτικής άμυνας επάγουν οξειδωτικό άγχος. Επομένως, ο σχηματισμός ROS και η αντιοξειδωτική δράση βρίσκονται σε ισορροπία υπό κανονικές συνθήκες. Αυτή η ισορροπία διαταράσσεται σε μια ποικιλία κλινικών καταστάσεων όταν οι αντιοξειδωτικές άμυνες είναι ανεπαρκείς, οδηγώντας σε οξειδωτικό στρες, το οποίο συχνά οδηγεί σε απόπτωση (HUANG, ZHANG, & CHEN, 2016).



Εικόνα 8: Παραγωγή ROS με μη φυσιολογική αντίδραση του O_2 με δεσμευμένο σε πρωτεΐνες Fe ή Cu (Barnham, Masters, & Bush, 2004)

1.3.2 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Τα μοναδικά οργανίδια που ονομάζονται μιτοχόνδρια είναι απαραίτητα για πολλές κυτταρικές διεργασίες, όπως η παραγωγή ATP, η ισορροπία ασβεστίου, η επιβίωση των κυττάρων και ο κυτταρικός θάνατος. Η παθοφυσιολογία της AD περιλαμβάνει έναν αριθμό κρίσιμων παραγόντων, συμπεριλαμβανομένης της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας. Σε σύγκριση με τις έρευνες με βάση την ηλικία των ασθενών, έχουν βρεθεί ποικίλες μιτοχονδριακές και μεταβολικές ανωμαλίες στους νευρώνες του υπόκαμπου των ασθενών με AD. Ο αριθμός των μιτοχονδρίων μειώθηκε σημαντικά στις βιοψίες εγκεφάλου AD, ενώ τα επίπεδα μιτοχονδριακού DNA και πρωτεΐνης αυξήθηκαν στο κυτταρόπλασμα και τα κενοτόπια. Αυτό συνδέεται με τη λιποφουσκίνη, το λυσόσωμα που είναι υπεύθυνο για την μιτοχονδριακή αποικοδόμηση με αυτοφαγία (Y. Zhao & Zhao, 2013).

Το σύμπλεγμα α-κετογλουταρικής αφυδρογονάσης (KGDHC) και το σύμπλοκο πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (PDHC), δύο ένζυμα που εμπλέκονται στο στάδιο περιορισμού του ρυθμού του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος, καθώς και η κυτοχρωματική οξειδάση (COX), το τελευταίο ένζυμο στη μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα που είναι υπεύθυνο για τη μείωση του μοριακού οξυγόνου, είναι τα βασικά ένζυμα οξειδωτικού μεταβολισμού που είναι σταθερά ανεπαρκή στο AD (X. Zhu, Su, Wang, Smith, & Perry, 2007). Αυτές οι μιτοχονδριακές ανωμαλίες βρέθηκαν συνοδευόμενες από οξειδωτική βλάβη υποδηλώνοντας με αυτό τον τρόπο ότι τα μιτοχόνδρια βλάπτονται καθ' όλη τη διάρκεια της εξέλιξης του AD. Συνεπώς, σημειώθηκε ότι η δραστηριότητα της μιτοχονδριακής οξειδάσης του κυτοχρώματος (σύμπλοκο IV) μειώθηκε σημαντικά στις φλοιώδεις περιοχές του εγκεφάλου AD. Η διαδικασία του νευροεκφυλισμού μπορεί να επιταχυνθεί από μια ανεπάρκεια σε αυτό το ένζυμο μεταφοράς ηλεκτρονίων, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της παραγωγής ROS και επακόλουθη μείωση των αποθεμάτων ενέργειας (Y. Zhao & Zhao, 2013).

1.3.3 ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Ο χαλκός (Cu), ο ψευδάργυρος (Zn) και ο σίδηρος (Fe), μεταξύ άλλων μεταβατικών μετάλλων, διαδραματίζουν καταλυτικούς ρόλους σε διάφορα ένζυμα και είναι ζωτικής σημασίας για μια ποικιλία βιολογικών διεργασιών στο ανθρώπινο σώμα, συμπεριλαμβανομένης της λειτουργίας του εγκεφάλου. Όταν ένας νευρώνας απελευθερώνει Cu, ρυθμίζει τη νευρωνική ενεργοποίηση αποκλείοντας λειτουργικά τους υποδοχείς NMDA και περιορίζοντας την είσοδο ασβεστίου στο κύτταρο. Το Zn αναστέλλει τους διεγερτικούς υποδοχείς NMDA, οι οποίοι παίζουν ρόλο στη νευροδιαμορφωτική του λειτουργία. Παράλληλα, το Fe είναι ζωτικής σημασίας για τις νευρωνικές διαδικασίες, καθώς η ανεπάρκεια του μπορεί να προκαλέσει μια σειρά νευροχημικών αλλαγών που μπορεί τελικά να οδηγήσουν σε γνωστικά ελλείμματα.

Παρόλα αυτά, τα επίπεδα και η κίνηση αυτών των μετάλλων ελέγχονται στενά, καθώς οποιαδήποτε δυσμενής μεταβολή στην ομοιόσταση μπορεί να οδηγήσει στη νευροτοξική παραγωγή ελεύθερων ριζών (Y. Zhao & Zhao, 2013). Ο ιππόκαμπος των ασθενών με AD έχει αποδειχθεί ότι περιέχει ασυνήθιστα υψηλές ποσότητες Cu, Zn και Fe, γεγονός που οδήγησε σε σημαντικές ιστοπαθολογικές αλλοιώσεων (X. Zhu, Su, Wang, Smith, & Perry, 2007). Η περίσσεια Fe ή Cu, για παράδειγμα, μπορεί να αλληλεπιδράσει άμεσα με οξυγόνο για να σχηματίσει το ιόν υπεροξειδίου, το υπεροξειδίο του υδρογόνου και τη ρίζα υδροξυλίου, γεγονός που μπορεί να προκαλέσει οξειδωτικό στρες και μεταβολικές αλλαγές που τελικά οδηγούν στο θάνατο των εγκεφαλικών κυττάρων (Y. Zhao & Zhao, 2013) (Markesbery, 1997).

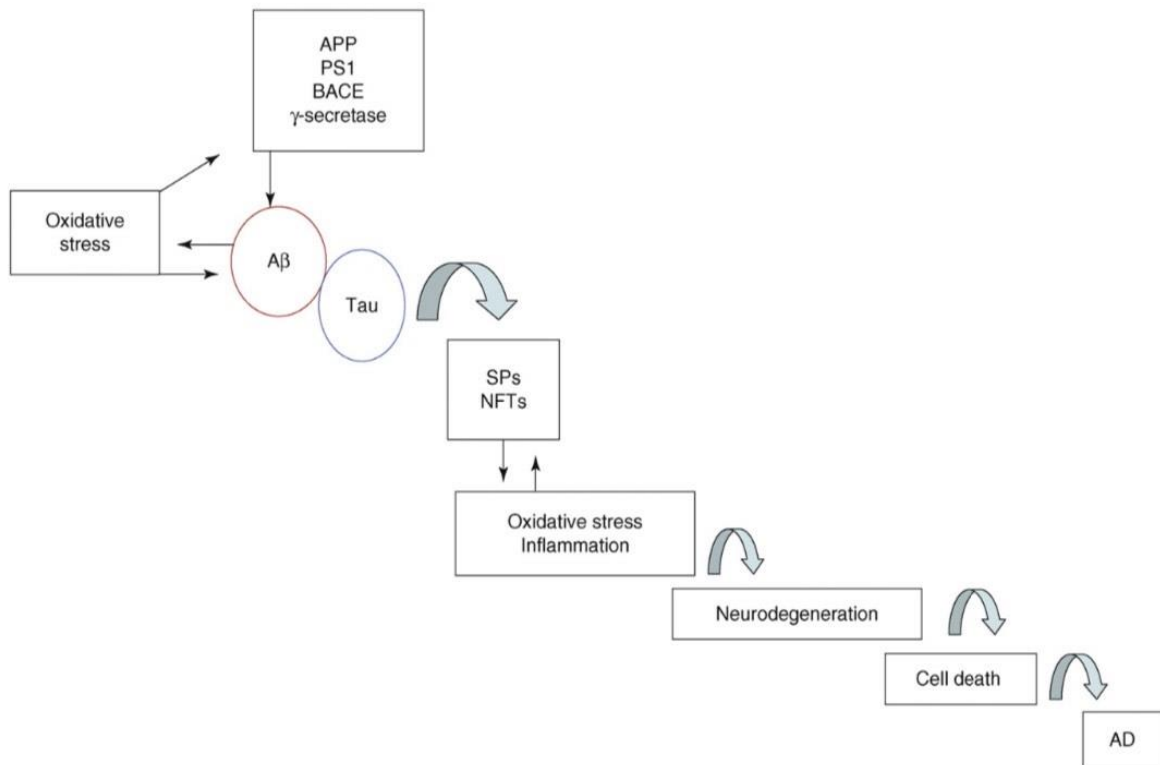
Τα πεπτίδια Αβ και τα μέταλλα μετάβασης μπορούν να αλληλεπιδράσουν άμεσα. Πράγματι, τόσο το Cu^{2+} όσο και το Zn^{2+} μπορεί να δεσμεύονται σε μονομερή Αβ, μειώνοντας τη μεταλλική ομοιόσταση και συμβάλλοντας άμεσα στην εναπόθεση Αβ σε εγκεφάλους AD μέσω παρεκκλίνων αλληλεπιδράσεων του Αβ με μεταλλικά ιόντα. Επιπλέον, η αλληλεπίδραση του Αβ με μεταβατικά μέταλλα μπορεί να είναι αιτία παραγωγής ROS. Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι οι ROS δημιουργήθηκαν από την αλληλεπίδραση των μεταβατικών μετάλλων με το Αβ και άρα μαζί με τη μεσολάβηση του Αβ είναι βασικοί συνεισφέροντες οξειδωτικού στρες προκαλώντας νευροτοξικότητα και παθογένεια AD (Y. Zhao & Zhao, 2013).

1.3.4 ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ Αβ

Η ανώμαλη συσσώρευση πεπτιδίων Αβ φαίνεται να ενθαρρύνει την οξειδοαναγωγική δυσαναλογία. Υπάρχουν ενδείξεις ότι το οξειδωτικό στρες μπορεί να ενισχύσει τη δημιουργία και τη συσσωμάτωση του Αβ, δημιουργώντας έναν φαύλο κύκλο που επιταχύνει την ανάπτυξη του AD (Mattson, 1997). Η συσσώρευση Αβ προκαλείται από αυξημένη σύνθεση και/ή μειωμένη κάθαρση των πεπτιδίων Αβ, η οποία προάγει έναν αριθμό κυτταρικών οδών σηματοδότησης και τελικά προκαλεί εκφυλισμό, νευρωνική απώλεια και γνωστική παρακμή.

Η συσσώρευση Αβ που σχετίζεται με την ηλικία συνδέθηκε με μεταλλάξεις APP και PS1, αυξημένο υπεροξειδίο του υδρογόνου, μονοξειδίο του αζώτου και αυξημένα οξειδωτικά κατιόντα πρωτεϊνών και λιπιδίων, αποδεικνύοντας ότι το Αβ ενθαρρύνει το οξειδωτικό στρες. Ο μηχανισμός σχηματισμού του Αβ έχει ως εξής: Το οξειδωτικό στρες μειώνει τη δραστηριότητα της Α-σεκρετάσης ενώ προάγει την έκφραση και την ενεργοποίηση της Β- και Γ-σεκρετάσης, ένζυμα κρίσιμα για την δημιουργία Αβ (Y. Zhao & Zhao, 2013).

Οι χαμηλές ποσότητες Αβ έχουν αποδειχθεί ότι έχουν νευροπροστατευτικά ή νευροτροφικά αποτελέσματα. Θα μπορούσαν να συμβάλουν στην υγιή λειτουργία των νευρωνικών κυττάρων και έτσι θα μπορούσαν να επηρεάσουν θετικά την κυτταρική οξειδοαναγωγική κατάσταση. Αντίθετα, το οξειδωτικό στρες μπορεί να ενισχύσει την ανώμαλη συσσώρευση και επιδείνωση συγκεκριμένων μορφών Αβ, η οποία μπορεί να μεταβάλει τη νευρωνική λειτουργία και να επιδεινώσει την οξειδωτική βλάβη στους νευρώνες, συμβάλλοντας στην παθολογική έναρξη της AD (Puzzo et al., 2008).



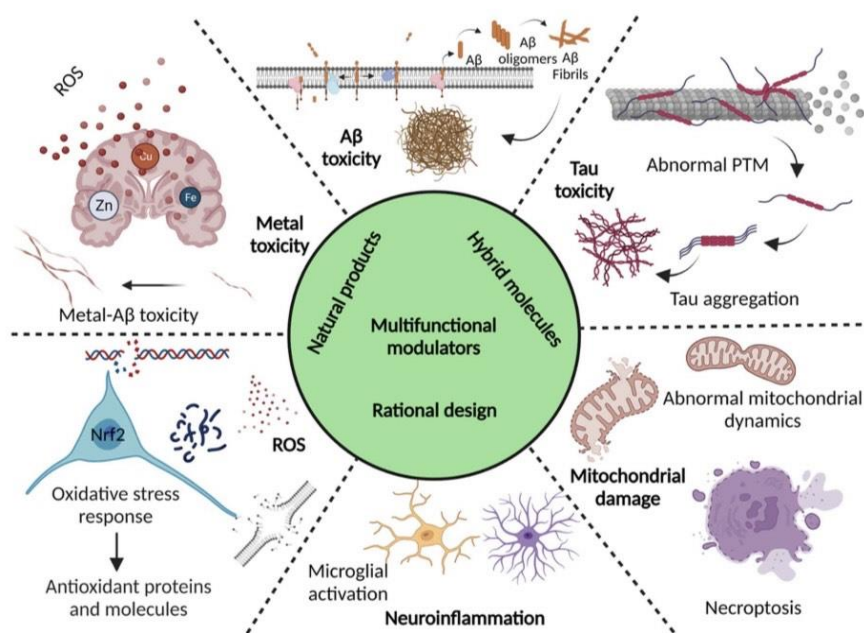
Εικόνα 9:Μοριακοί μηχανισμοί και παθολογία στο AD (Praticò, 2008)

1.3.5 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΑΥ.

Η υπερφωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη tau είναι το κύριο συστατικό του NFT, μια άλλη πτυχή της παθολογίας AD που συνδέεται με τον νευροεκφυλισμό και τη γνωστική απώλεια (Goedert & Spillantini, 2006). Η ικανότητα του Tau να προσκολλάται στην τουμπουλίνη και να υποστηρίζει με αυτόν τον τρόπο την παραγωγή μικροσωληνίσκων παρεμποδίζονται αμφότερα από την υπερφωσφορυλίωση του, η οποία προκαλεί την αυτοσυναρμολόγηση του tau σε νημάτια (Iqbal, Liu, Gong, Alonso, & Grundke-Iqbal, 2009). Υπάρχουν στοιχεία που συνδέουν το οξειδωτικό στρες με τη παθολογία tau. Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι η ευαισθησία των κυττάρων στο οξειδωτικό στρες ενισχύθηκε από την υπερέκφραση της πρωτεΐνης tau (Stamer, Vogel, Thies, Mandelkow, & Mandelkow, 2002).

Επιπλέον, η αλληλεπίδραση του Aβ και του Tau στη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία είχε ως αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία του μιτοχονδριακού συμπλέγματος IV, το οποίο εξαρτάται από το Aβ, και του συμπλέγματος I που

εξαρτάται από το Tau (Rhein et al., 2009). Οι επιδράσεις των tau και Abeta στη μιτοχονδριακή λειτουργία αποδείχθηκε ότι είναι συνεργατικές και σχετίζονται με την ηλικία, οδηγώντας σε μείωση της παραγωγής ATP και της μιτοχονδριακής αναπνευστικής ικανότητας, η οποία τελικά προκάλεσε νευρωνικό θάνατο (Y. Zhao & Zhao, 2013).



Εικόνα 10: Πολυλειτουργικοί διαμορφωτές που στοχεύουν πολλαπλές παθολογικές οδούς ασθένειας της AD (Govindaraju & Ramesh, 2022).

1.4 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΑΡΕΜΒΑΣΕΙΣ

Η πιο σημαντική προϋπόθεση για την αναγνώριση της σοβαρότητας της νόσου και την παροχή στον ασθενή της σωστής φροντίδας είναι η έγκαιρη διάγνωση της AD. Παρόλο που δεν υπάρχουν αναγνωρισμένες διαδικασίες για τη διάγνωση της AD, η τρέχουσα διάγνωση βασίζεται κυρίως στην αξιολόγηση της συμπεριφοράς και της γνωστικής κατάστασης των ασθενών (Rajasekhar & Govindaraju, 2018). Οι εξωκυτταρικές ΑΒ γεροντικές πλάκες και τα NFT της υπερφωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης tau, οι οποίες συνδέονται με τον νευροεκφυλισμό και τη συρρίκνωση του εγκεφάλου, είναι δύο παθολογικά χαρακτηριστικά της AD.

Τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα της AD περιλαμβάνουν είδη συσσωμάτωσης Αβ και υπερφωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη tau, και στοχεύουν στη διάγνωση της νόσου χρησιμοποιώντας χημικά εργαλεία όπως η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET), η απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού (MRI), και οι μέθοδοι απεικόνισης με φθορισμό. Η κλινική ανίχνευση των βιοδεικτών Αβ και tau είναι πλέον δυνατή λόγω των εξελίξεων στους ανιχνευτές PET. Σωματικά υγρά όπως εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY), αίμα, σάλιο και ούρα περιέχουν δείκτες που σχετίζονται με ασθένειες. Σαν αποτέλεσμα, χημικά εργαλεία για στόχευση απεικόνισης NIRF, PET και MR έχουν καθοριστεί διαφορετικοί βασικοί και έμμεσοι βιοδείκτες για τη διάγνωση της AD.

Στα κυκλοφορούντα υγρά, βιοδείκτες πρωτεϊνών, RNA και μεταβολιτών μπορούν να βρεθούν χρησιμοποιώντας μια ποικιλία μεθόδων ανίχνευσης, συμπεριλαμβανομένων MS, ELISA, microarrays και αισθητήρων με βάση το χαρτί (Govindaraju & Ramesh, 2022). Στην κλινική έρευνα και πρακτική, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) και οι βιοδείκτες με βάση το αίμα επιτρέπουν ακριβέστερη διάγνωση και αποτελεσματικό έλεγχο. Η παρουσία άνοιας σε έναν ασθενή μπορεί να προσδιοριστεί με κλινικά στοιχεία, όπως γνωστικές εξετάσεις, οικογενειακό ιστορικό, δραστηριότητες καθημερινής ζωής και κλινικές αλλαγές με την πάροδο του χρόνου. Το PET, η μαγνητική τομογραφία (MRI), η οσφυϊκή παρακέντηση και οι πιο πρόσφατες εξετάσεις αίματος μπορούν περιστασιακά να βοηθήσουν στην επιβεβαίωση ή τον αποκλεισμό της AD σε ασθενείς με άνοια (Dokholyan, Mohs, & Bateman, 2022).

1.4.1 ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ

1.4.1.1 CSF ΚΑΙ ΑΙΜΑ

Τα κυκλοφορούντα υγρά συμπεριλαμβανομένου του ENY (εγκεφαλονωτιαίο υγρό) και του αίματος πιστεύεται ότι αντικατοπτρίζουν σχετικές αλλαγές στον εγκέφαλο των ασθενών με AD. Αυτές οι διαδικασίες έχουν το πλεονέκτημα ότι είναι χαμηλού κινδύνου, απλές και οικονομικές (Govindaraju & Ramesh, 2022). Η μέθοδος οσφυϊκής παρακέντησης χρησιμοποιείται για να πάρει το CSF ή ENY, ένα άχρωμο υγρό που παράγεται στο χοριοειδές πλέγμα και κυκλοφορεί μέσω του κεντρικού καναλιού του νωτιαίου μυελού. Οποιοσδήποτε βιοχημικές ανωμαλίες και αλλαγές

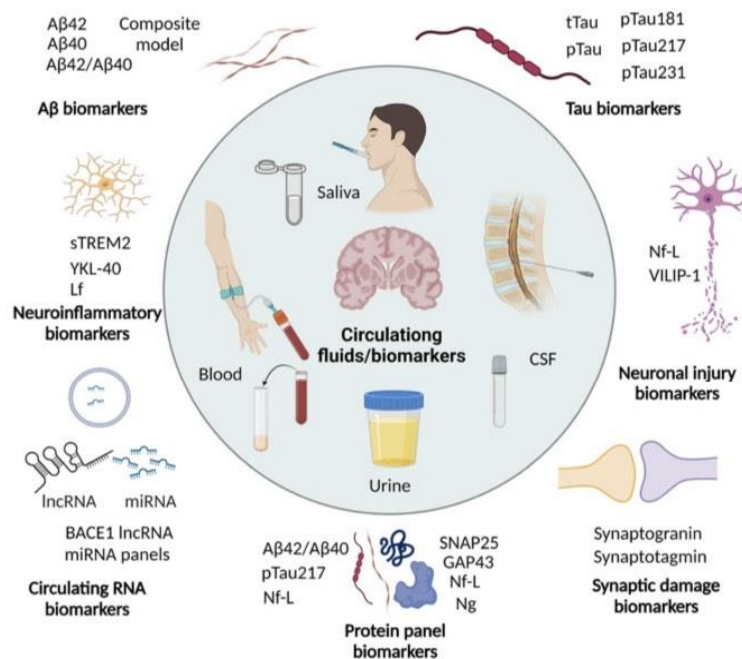
στις συγκεντρώσεις βιομοριακών δεικτών που λαμβάνουν χώρα στον εγκέφαλο πιστεύεται ότι απαιτούν επανεισαγωγή στο ENY. Κατά συνέπεια, τα συσσωματώματα Αβ και tau και οι συγκεντρώσεις τους βρέθηκαν χρησιμοποιώντας CSF για να βοηθήσουν στην έγκαιρη διάγνωση του AD.

Σε σύγκριση με τα επίπεδα του ENY, οι συγκεντρώσεις στο αίμα των ειδών Αβ και tau (πλάσμα και ορός) είναι σημαντικά χαμηλότερες. Η δημιουργία υπερευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης βιοδεικτών για δείγματα αίματος είναι απαραίτητη για την επίλυση αυτής της συμφόρησης (Rajasekhar & Govindaraju, 2018). Κατά συνέπεια, οι ακόλουθοι κυκλοφορούντες βιοδείκτες στο ENY και στο αίμα που χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση AD είναι οι εξής:

1. Το χαμηλό ποσοστό στο πλάσμα Αβ42 και η αναλογία Αβ42/Αβ40 υποστηρίζουν τη διάγνωση της AD. Η σχέση μεταξύ των πεπτιδίων Αβ και της νόσου AD ανακαλύφθηκε χρησιμοποιώντας την τεχνική φασματομετρίας μάζας (MS) και δημιουργήθηκε ένα μαθηματικό μοντέλο βασισμένο στην αναλογία Αβ42 προς Αβ40. Ως αποτέλεσμα, το μοντέλο ήταν σε θέση να διακρίνει μεταξύ MCI, AD και υγιών ασθενών με ακρίβεια 90%, ευαισθησία 96, 7% και ειδικότητα 81% (Thimmaiah Govindaraju, 2022).
2. Επειδή το tau είναι παθολογικά φωσφορυλιωμένο (p-tau φωσφορυλιωμένο) σε ασθενείς με AD, το p-tau αναμένεται να λειτουργήσει ως βιοδείκτης για τη διάγνωση της πάθησης. Συγκρίνοντας τους ασθενείς AD με υγιή άτομα, βρέθηκαν υψηλότερα επίπεδα του tau , του p-tau στο CFS και του Tau στο πλάσμα εμφανίζονται στους AD ασθενείς σε σύγκριση που έγινε με υγιείς (Algarni, Bima, & Elsamanoudy, 2020).
3. Λόγω της αλλοιωμένης ποσότητας της μετασυναπτικής πρωτεΐνης νευροκρανίνης, παρατηρήθηκε συναπτική βλάβη στους νευρώνες σε ασθενείς με AD. Η νευροκρανίνη είναι ένας πρώιμος προκλινικός βιοδείκτης AD που συσχετίζεται με άλλους δείκτες ENY (όπως Αβ και tau), ατροφία του εγκεφάλου και γνωστική εξασθένηση.
4. Η έρευνα για το sTREM2, έναν υποδοχέα ενεργοποίησης που εκφράζεται σε μυελοειδή κύτταρα, αποκάλυψε αλλοιώσεις στο CSF και τη σχέση του με άλλους βιοδείκτες, αποδεικνύοντας τη διαγνωστική του χρησιμότητα σε ασθενείς με AD. Μειωμένη Αβ42 στο ENY, η εναπόθεση Αβ στον εγκέφαλο και η ατροφία συσχετίζονται όλα με αυξημένα επίπεδα sTREM2 στο CSF. Επίσης, η ανάλυση των επιπέδων του YKL-40 στο πλάσμα με άλλους

βιοδείκτες AD αποκάλυψαν αρνητική και θετική συσχέτιση με την εναπόθεση Αβ και την απόδοση μνήμης, αντίστοιχα.

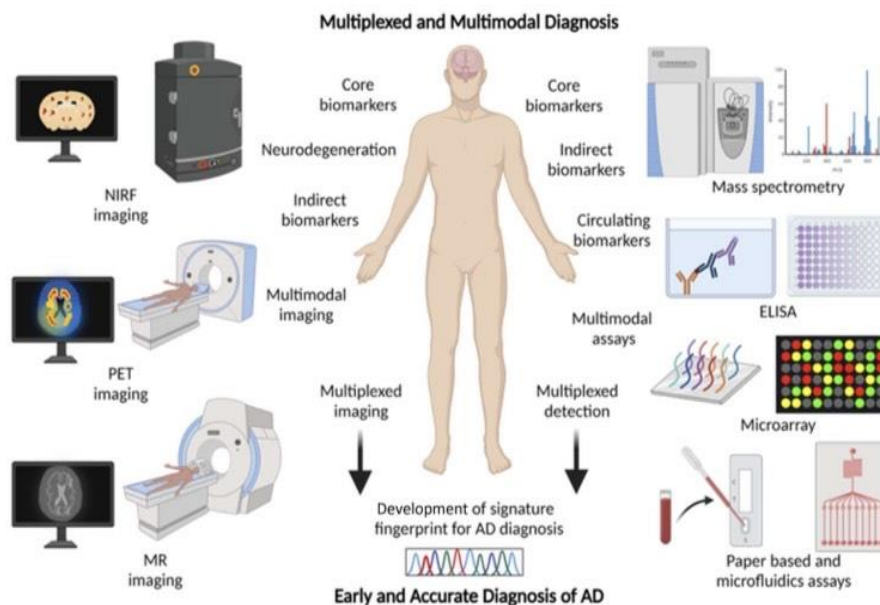
5. Στις διαταραχές του CSF, ο πρωτεϊνικός δείκτης Neurofilament (NF-L) υποδεικνύει την παρουσία νευρωνικής βλάβης. Σε συγκρίσεις που έγιναν τα επίπεδα NF-L στο πλάσμα ήταν σημαντικά υψηλότερα σε άτομα με άνοια από ό,τι σε υγιείς ανθρώπους. Επιπλέον, η πρωτεΐνη αισθητήρα ασβεστίου visinin 1 (VILIP-1), η οποία υπάρχει στο CSF, μπορεί να λειτουργήσει ως διαγνωστική και προγνωστική ένδειξη διάγνωσης.
6. Τα μη κωδικοποιημένα κυκλοφορούντα RNAs (ncRNAs) μπορεί να έχουν ρόλο στην ανάπτυξη της ασθένειας και να χρησιμεύσουν ως διαγνωστικοί δείκτες για του AD. Τέσσερα μακριά μη κωδικοποιημένα RNAs (lncRNAs) που συνδέονται με τη νόσο AD εξετάστηκαν στο πλάσμα και αποδείχθηκε ότι οι ασθενείς με τη νόσο είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα αυτών των lncRNAs. Τέλος, η εξαιρετική ανάλυση ευαισθησίας και εξειδίκευσης πρωτεϊνών σε δείγματα πλάσματος από περιπτώσεις AD επέτρεψε τον διαχωρισμό ασθενών με MCI από AD. Κατά συνέπεια, οι πρωτεΐνες και οι μεταβολίτες μπορούν να βοηθήσουν στην ταχεία και ακριβή διάγνωση της AD (Thimmaiah Govindaraju, 2022).
- 7.



Εικόνα 11: Βιοδείκτες σε ENY, αίμα, σάλιο και ούρα για τη διάγνωση της AD (Govindaraju & Ramesh, 2022).

1.4.2 ΠΟΛΥΤΡΟΠΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Οι μέθοδοι χημικής απεικόνισης που στοχεύουν το NIRF, το PET και το MR έχουν αναγνωριστεί ως σημαντικοί και έμμεσοι δείκτες για τη διάγνωση της AD. Η δημιουργία χημικών ανιχνευτών για πολυτροπική απεικόνιση αφαιρεί τα εμπόδια και βελτιώνει την ευαισθησία, την ειδικότητα και την ανάλυση της απεικόνισης, η οποία βοηθά στην ακριβή διάγνωση της AD. Μια άλλη μέθοδος για την αύξηση της ακρίβειας και της αξιοπιστίας της διάγνωσης είναι η ταυτόχρονη ανίχνευση διαφόρων διαγνωστικών βιοδεικτών μέσω πολυπλεξίας (Govindaraju & Ramesh, 2022).



Εικόνα 12: Πολυπλεξία και πολυτροπική προσέγγιση για έγκαιρη και ακριβή διάγνωση της AD (Govindaraju & Ramesh, 2022).

Η μελλοντική έρευνα σχετικά με τη διάγνωση AD μπορεί να επικεντρωθεί στην πολυπλεκτική ανίχνευση αρκετών κυκλοφορούντων βιοδεικτών χρησιμοποιώντας διάφορες δοκιμασίες ή ενσωματωμένες μικροσυστοιχίες. Μια ποικιλία μεθόδων ανίχνευσης, συμπεριλαμβανομένων των MS, ELISA, μικροσυστοιχίες, και αισθητήρες με βάση το χαρτί, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εύρεση πρωτεϊνών, RNA, και βιοδείκτες μεταβολίτη σε κυκλοφορούντα υγρά. Το μέλλον της διάγνωσης AD είναι η ανίχνευση πολλαπλών βιοδεικτών χρησιμοποιώντας πολυπλεκτικές και πολυτροπικές τεχνικές για την παραγωγή των δακτυλικών αποτυπωμάτων. Αυτά τα χαρακτηριστικά και τα δακτυλικά

αποτυπώματα έχουν την ικανότητα για έγκαιρη διάγνωση, ακριβή ταξινόμηση κλινικών σταδίων για καλύτερη διαχείριση και εξατομικευμένη ανίχνευση και θεραπεία για ασθενείς με AD (Thimmaiah Govindaraju, 2022).

1.4.3 ΝΕΥΡΟΨΥΧΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ

Μελέτες σε άτομα με αμνητική MCI έχουν δείξει ότι η επεισοδιακή μνήμη, όπως η ικανότητα ανάκλησης μιας καθυστερημένης λίστας λέξεων, η σημασιολογική μνήμη, η επεξεργασία προσοχής και η διανοητική ταχύτητα μπορούν όλα να χρησιμοποιηθούν για τον εντοπισμό ασθενών που τελικά θα αποκτήσουν άνοια. Ομοίως, η λεκτική και οπτική μνήμη, η συνειρμική μάθηση, το λεξιλόγιο, η εκτελεστική λειτουργία και άλλες λεκτικές εκτιμήσεις της γενικής νοημοσύνης επιδεινώθηκαν κατά την έναρξη σε μια αναδρομική εξέταση ατόμων με MCI που είχαν ελεγχθεί σε AD (Chong & Sahadevan, 2005).

1.4.4 ΜΑΓΝΗΤΙΚΗ ΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ(MRI)

Είναι πλέον εφικτό να διερευνηθούν οι αλλαγές στην ανατομία του εγκεφάλου *in vivo* κατά τη διάρκεια της υγιούς γήρανσης και σε εκφυλιστικές διαταραχές που σχετίζονται με την ηλικία, με την χρήση μεθόδων ποσοτικής απεικόνισης μαγνητικού συντονισμού υψηλής ανάλυσης (MRI). Αυτές οι μέθοδοι είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για τον εντοπισμό της ανατομικής αιτίας της νόσου του Alzheimer's (AD) και για τον εντοπισμό ατόμων που κινδυνεύουν να προσβληθούν από την ασθένεια.

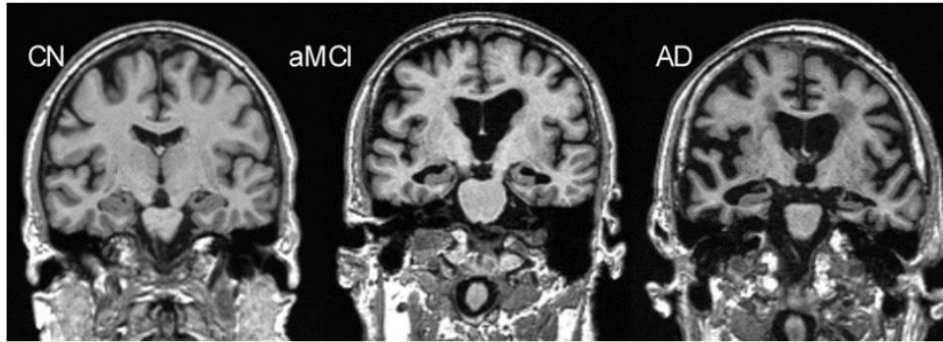
Ο ενδορρινικός φλοιός (EC) και ο σχηματισμός ιππόκαμπου (HF) αποτελούν μέρος της μνήμης του συστήματος του μεσικού κροταφικού λοβού (deToledo-Morrell et al., 2004). Η μείωση των ενδορρινικών όγκων του φλοιού και του ιππόκαμπου έχει αποδειχθεί ότι είναι σε θέση να προβλέψει ποιοι ασθενείς με MCI θα αναπτύξουν τελικά AD, σύμφωνα με διαχρονικές μελέτες. Οι ασθενείς που τελικά θα αποκτήσουν AD αναγνωρίζονται από την ατροφία του μεσαίου κροταφικού λοβού, η οποία μετράται χρησιμοποιώντας μια τυποποιημένη οπτική κλίμακα 11 σημείων. Η ανάλυση μαγνητικής τομογραφίας ολόκληρου του εγκεφάλου, του ιππόκαμπου και του ενδορρινικού φλοιού αποκάλυψε ότι η μετατροπή των ασθενών με αμνητική MCI

σε AD αφορούσε τις μεγαλύτερες περιπτώσεις ατροφίας σε σύγκριση με άλλους ασθενείς που δεν ανήκαν σε αυτή την κατηγορία (Chong & Sahadevan, 2005).

Πάνω από το 70% των ασθενών που αξιολογήθηκαν για νευροεκφυλιστική ασθένεια είχαν μη φυσιολογικά ευρήματα στην μαγνητική τομογραφία που δείχνουν ένα αγγειακό συστατικό, σύμφωνα με μελέτες για τη νευροαπεικόνιση. Επιπλέον, ο μεγαλύτερος όγκος WMH συνδέεται με τον εγκεφαλικό υπομεταβολισμό και τη γνωστική εξασθένηση, ειδικά σε δοκιμές εκτελεστικής λειτουργίας, και οι υπερεντάσεις λευκής ύλης (WMHs) στη μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου υποδεικνύουν προφίλ καρδιαγγειακού κινδύνου (Garriga et al., 2015).

Οι μέθοδοι μαγνητικής τομογραφίας διατίθενται σε δύο μορφές: δομική απεικόνιση (sMRI) και λειτουργική απεικόνιση (fMRI). Το sMRI χρησιμοποιείται για την εξέταση της ατροφίας του εγκεφάλου και είναι αναποτελεσματικό ως μέθοδος διάγνωσης της AD. Η παρατηρούμενη ατροφία δεν θα μπορούσε να είναι μοναδική για την AD και θα μπορούσε να συνδεθεί με μια ποικιλία νευρωνικών διαταραχών. Χρησιμοποιώντας το fMRI, οι ερευνητές μπορούν να εξετάσουν τη λειτουργική ακεραιότητα του εγκεφάλου, η οποία περιλαμβάνει τη νευρωνική δραστηριότητα, την ανάπτυξη μνήμης και τις γνωστικές αλλαγές με την πάροδο του χρόνου. Επιπλέον, τα αποτελέσματα του fMRI έδειξαν ότι η λειτουργική συνδεσιμότητα άλλαξε κατά τη διάρκεια της εξέλιξης της AD. Ως αποτέλεσμα, είναι πιθανό ότι η παρακολούθηση αλλαγών στη λειτουργική συνδεσιμότητα χρησιμοποιώντας το fMRI μπορεί να είναι ένα χρήσιμος διαγνωστικός βιοδείκτης για το AD (Rajasekhar & Govindaraju, 2018).

Στην πραγματικότητα, οι παθολογικές αναλύσεις των εγκεφάλων ατόμων με σχετικά ήπιες μορφές AD αποκάλυψαν περισσότερες νευροεκφυλιστικές αλλοιώσεις, δηλαδή αλλαγές στον εγκέφαλο (όπως πλάκες και μπερδέματα) σε EC και HF συγκριτικά με άλλες περιοχές του εγκεφάλου. Σε σύγκριση μεταξύ των ατόμων με ατροφία ιππόκαμπου και ατόμων με ατροφία EC αποδείχθηκε ότι οι πρώτοι ήταν 1,5 φορές σε μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης AD ενώ οι δεύτεροι ήταν 1,6 φορές (deToledo-Morrell et al., 2004).

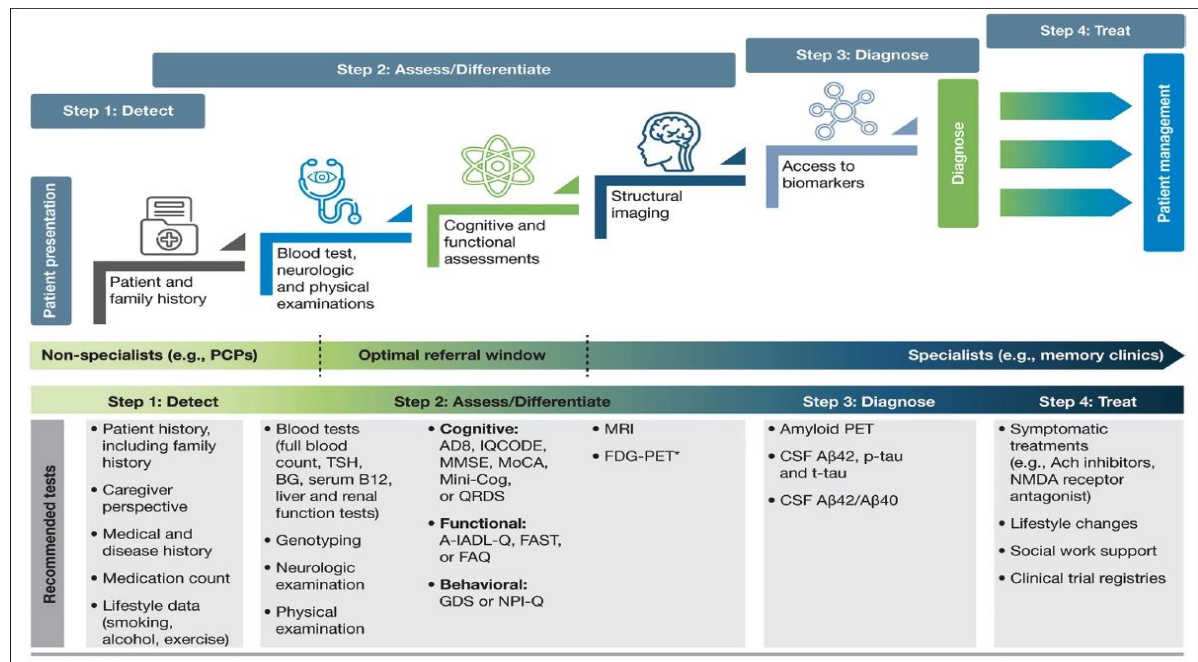


Εικόνα 13: Προοδευτική ατροφία σε ηλικιωμένους με γνωστικά φυσιολογικούς (CN), με αμνητική ήπια γνωστική εξασθένηση (aMCI) και με θέματα νόσου Αλτσχάιμερ (AD) (C. R. Jack, 2011)

1.4.5 ΗΛΕΚΤΡΟΕΓΚΕΦΑΛΟΓΡΑΦΙΑ (EEG)

Τα χαρακτηριστικά στο qEEG μπορεί να είναι σε θέση να προβλέψουν την άνοια σε ασθενείς με MCI. Ένα μη φυσιολογικό ΗΕΓ στα αρχικά στάδια της AD μπορεί να υποδηλώνει μια πιο σοβαρή μείωση της γνωστικής ικανότητας. Για να εφαρμοστούν στις μεταβλητές EEG, επιλέχθηκαν οι τέσσερις τυπικές ζώνες συχνοτήτων δέλτα (2-4 Hz), θήτα (4-8 Hz), άλφα (8-13 Hz), βήτα (13-20 Hz) και η μέση συχνότητα μεσαίου φάσματος (4-20 Hz). Η σχετική ισχύς, η οποία στη συνέχεια εκφράστηκε ως ποσοστό, υπολογίστηκε διαιρώντας την ισχύ σε μία ζώνη συχνοτήτων με το άθροισμα όλης της ισχύος σε όλες τις ζώνες. Έχει αποδειχθεί ότι ενώ η δραστηριότητα άλφα και βήτα μειώθηκε μετά από 2, 5 χρόνια παρακολούθησης των ασθενών, η δραστηριότητα δέλτα και θήτα αυξήθηκε δραματικά. Σύμφωνα με διάφορες εκτιμήσεις που πραγματοποιήθηκαν σε ομάδες υγιών ανθρώπων, η χαμηλή ισχύς βήτα σχετίζεται με την αναμενόμενη εξέλιξη της γνωστικής παρακμής μετά από πέντε χρόνια. Μια άλλη μελέτη διαπίστωσε ότι μετά από δύο χρόνια παρακολούθησης, υγιή άτομα που είχαν αυξημένη δύναμη δέλτα έδειξαν επίσης μείωση. Η χαμηλή ισχύς βήτα συνδέεται με την αναμενόμενη εξέλιξη της γνωστικής επιδείνωσης μετά από πέντε χρόνια, σύμφωνα με διάφορες έρευνες που διεξήχθησαν σε ομάδες υγιών ατόμων. Σε μια άλλη έρευνα, υγιείς συμμετέχοντες που είχαν

αυξημένη δύναμη δέλτα έδειξαν επίσης επιδείνωση μετά από δύο χρόνια παρακολούθησης (Jelic et al., 2000).



Εικόνα 14: Ένα σταδιακό γράφημα για την επισήμανση βασικών σταδίων στη διαγνωστική διαδικασία, μαζί με τις συνιστώμενες δοκιμές για την υποστήριξη κάθε βήματος (Porsteinsson, Isaacson, Knox, Sabbagh, & Rubino, 2021).

1.4.6 ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η νόσος του Αλτσχάιμερ δεν έχει γνωστή αποκλειστική θεραπεία μέχρι σήμερα. Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται μπορούν να μειώσουν τα συμπτώματα της ασθένειας, αλλά δεν μπορούν να σταματήσουν ή να επιβραδύνουν την πορεία της νόσου. Οι πιθανοί τροποποιητικοί παράγοντες της νόσου περιελάμβαναν οδούς νευροπροστασίας, αντιφλεγμονώδους και/ή νευρογένεσης που συνδέονται με διαταραχές παθολογίας αμυλοειδούς ή tau. Η επανατοποθέτηση είναι η δημιουργία νέων εφαρμογών για ήδη υπάρχοντα ή διακοπτόμενα φαρμακευτικά προϊόντα. Η νέα χρήση μπορεί να είναι στοχευμένη και να συνδέεται με τον αρχικό μηχανισμό δράσης (MOA) ή μπορεί να είναι εκτός στόχου και να συνδέεται με διαφορετικό MOA. Οι ενώσεις με άγνωστα MOA συμπεριλήφθηκαν εάν παρουσίαζαν συνάφεια με το AD με βάση επιδημιολογικά λογικά δεδομένα.

Η έρευνα in vitro, τα ζωικά μοντέλα, οι επιδημιολογικές ή παρατηρητικές μελέτες σε ανθρώπους και τα δεδομένα που βασίζονται σε πολυάριθμες πηγές αποδεικτικών στοιχείων ήταν οι πρώτες τέσσερις μορφές πληροφοριών που εξετάστηκαν (Appleby, Nacopoulos, Milano, Zhong, & Cummings, 2013). Οι προαναφερθείσες ενώσεις προσέφεραν μερικές ευεργετικές ενώσεις για την πάθηση, αλλά απορρίφθηκαν σε κάποιο κλινικό στάδιο ή δεν υπήρχαν αρκετές πληροφορίες για το FDA (Food and Drug Administration of the United States) για να τις εγκρίνει ως φάρμακα για τη θεραπεία της νόσου.

Υπάρχουν τώρα πέντε εγκεκριμένα από την FDA φάρμακα στην αγορά για τη θεραπεία των συμπτωμάτων της νόσου του Alzheimer's. Τα φάρμακα μπορεί να ενισχύσουν κάπως τη μνήμη και να μειώσουν τη σύγχυση, αλλά δεν μπορούν να αποτρέψουν την επιδείνωση της νόσου. Λειτουργεί καλύτερα ένα φάρμακο όταν ένα άτομο το χρησιμοποιεί κατά τη διάρκεια των ήπιων έως μέτριων φάσεων της πάθησης, λειτουργεί καλύτερα (Casey, Antimisiaris, & O'Brien, 2010). Παραδοσιακά, υπάρχουν δύο κατηγορίες εγκεκριμένων κλινικών θεραπειών της Υπηρεσίας Τροφίμων και Φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών (FDA) για την AD:

1. αναστολείς χολινεστεράσης και
2. ανταγωνιστής υποδοχέα N-μεθυλ- γ -ασπαρτικού (NMDA)

Τα επίπεδα ακετυλοχολίνης στον μετωπιαίο φλοιό και τον ιππόκαμπο, περιοχές στενά συνδεδεμένες με τη μνήμη και τη γνώση, είναι αισθητά χαμηλότερα σε ασθενείς AD. Στη νόσο του Αλτσχάιμερ, οι μετασυναπτικοί χολινεργικοί υποδοχείς εξακολουθούν να είναι ως επί το πλείστον άθικτοι παρά την απώλεια χολινεργικών νευρώνων (Barner & Gray, 1998). Οι αναστολείς της χολινεστεράσης (CIs) είναι μια ομάδα τεσσάρων φαρμάκων που έχουν λάβει άδεια για τη θεραπεία της άνοιας που μοιάζει με Αλτσχάιμερ στο ήπιο έως μέτριο στάδιο. Αυτές περιλαμβάνουν τη γαλανταμίνη (Razadyne), την τακρίνη (Cognex), τη δονεπεζίλη (Aricept) και τη ριβαστιγμίνη (Exelon). Επιπλέον, σοβαρές ή τελικές ασθένειες έχουν εγκριθεί για χρήση με δονεπεζίλη. Η τακρίνη δεν περιλαμβάνεται επειδή έχει υψηλό κίνδυνο ηπατικής βλάβης και χορηγείται μόνο μερικές φορές στη σύγχρονη εποχή. Το Memantine (Namenda), το πέμπτο φάρμακο AD, είναι το μόνο με έγκριση FDA για μέτρια έως σοβαρά στάδια AD. Αναστέλλει τη δράση του γλουταμινικού αναστέλλοντας τους υποδοχείς NMDA και μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο του ή σε συνδυασμό με αναστολέα χολινεστεράσης (Casey, Antimisiaris, & O'Brien, 2010).

1.4.6.1 TAKPINH (COGNEX)

Η τακρίνη (τετραϋδροαμινοακριδίνη) είναι το πρώτο φάρμακο που εγκρίνεται από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) για τη θεραπεία της νόσου του Alzheimer. Η τακρίνη είναι ένας ανταγωνιστικός, αναστρέψιμος αναστολέας χολινεστεράσης που ωφελεί συμπτωματικά ορισμένους ασθενείς με ήπια έως μέτρια νόσο Αλτσχάιμερ. Τόσο η βουτυρυλοχολινεστεράση όσο και η ακετυλοχολινεστεράση αναστέλλονται από την τακρίνη. Το ένζυμο που είναι κυρίως υπεύθυνο για το μεταβολισμό της ακετυλοχολίνης είναι η ακετυλοχολινεστεράση. Έτσι, η ακετυλοχολίνη είναι πιο εύκολα διαθέσιμη για να προσκολληθεί στους μουσκαρινικούς υποδοχείς όταν αναστέλλεται η δραστηριότητά της.

Η απώλεια χολινεργικών εγκεφαλικών κυττάρων, τα οποία είναι ζωτικής σημασίας για τη μνήμη και τη γνώση, συνδέεται με τη νόσο του Αλτσχάιμερ. Ως εκ τούτου, πιστεύεται ότι αυτή η αύξηση της διαθεσιμότητας ακετυλοχολίνης οδηγεί σε ισχυρότερη μουσκαρινική επίδραση και καλύτερη μνήμη και γνώση (Crismon, 1994). Η χρήση της τακρίνης περιορίζεται από περιφερικές χολινεργικές ανεπιθύμητες ενέργειες, ανοχή και ηπατοτοξικότητα. Έως και το 50% των ασθενών που έλαβαν τακρίνη παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης στο αίμα, δείκτη ηπατοτοξικότητας. Ως αποτέλεσμα, είναι απαραίτητη η περιοδική αξιολόγηση της ηπατικής λειτουργίας, η οποία αυξάνει την πίεση στον ασθενή ή / και τον φροντιστή (Barner & Gray, 1998).

1.4.6.2 ΔΟΝΕΠΕΖΙΛΗ (ARICEPT)

Η βουτυρυλοχολινεστεράση, η οποία υπάρχει τόσο εντός όσο και εκτός του κεντρικού νευρικού συστήματος, δεν φαίνεται να επηρεάζεται από τη δονεπεζίλη, η οποία είναι εξαιρετικά επιλεκτική για την ακετυλοχολινεστεράση, η οποία βρίσκεται κυρίως στον εγκέφαλο. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με την επίδραση της τακρίνης, η οποία εμποδίζει τις χολινεστεράσες να λειτουργούν σε όλο το σώμα. Σε σύγκριση με την τακρίνη, η δονεπεζίλη ήταν 97 φορές λιγότερο ισχυρή στην αναστολή της βουτυρυλοχολινεστεράσης και 14 φορές λιγότερο ισχυρή στην αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης. Σύμφωνα με αυτά τα ευρήματα, η δονεπεζίλη είναι ένας

μέτρια ισχυρός και ειδικός αναστολέας ακετυλοχολινεστεράσης. Ένα πλεονέκτημα της donepezilης έναντι της τακρίνης είναι το βολικό δοσολογικό σχήμα, καθώς δοσολογείται μία φορά την ημέρα, ενώ η τακρίνη απαιτεί χορήγηση τέσσερις φορές την ημέρα. Επιπλέον, επειδή η donepezilη δεν απαιτεί επιπλέον διαχείριση του ήπατος, επιτυγχάνει το θεραπευτικό όριο πιο γρήγορα και κοστίζει λιγότερο ως φάρμακο από την τακρίνη (Barner & Gray, 1998).

1.4.6.3 ΓΑΛΑΝΤΑΜΙΝΗ (RAZADYNE)

Οι γιατροί είναι πιθανό να συστήσουν τη γαλανταμίνη ως θεραπεία πρώτης γραμμής για ήπια έως μέτρια AD, ειδικά μετά την αναδιατύπωσή του ως κάψουλα παρατεταμένης αποδέσμευσης που πρέπει να λαμβάνεται μόνο μία φορά την ημέρα. Ένας από τους τρεις αναστολείς ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) η γαλανταμίνη (Prnvlonic, Hampel, & Pantel, 2010), έχει τη μόνη γνωστή δράση αλλοστερικού νικοτινικού ρυθμιστή υποδοχέα ακετυλοχολίνης που έχει επαληθευτεί επιστημονικά (nAChRs). Αυτή η τελευταία δραστηριότητα θεωρείται ιδιαίτερα αξιοσημείωτη, καθώς οι nAChRs παίζουν μεγάλο ρόλο στη μείωση της Κεντρικής χολινεργικής νευροδιαβίβασης σε ασθενείς με AD. Επειδή οι γαστρεντερικές παρενέργειες είναι σχετικά σπάνιες όταν συμβαίνουν, δεν υπάρχουν ανησυχίες για την ασφάλεια με τη χρήση γαλανταμίνης (Lilienfeld, 2002).

1.4.6.4 ΡΙΒΑΣΤΙΓΜΙΝΗ (EXELON)

Ο δομικός τύπος του αναστολέα της χολινεστεράσης ριβαστιγμίνης διαφέρει από εκείνους των άλλων αναστολέων που αναφέρονται παραπάνω. Με την προσκόλληση στο ένζυμο ακετυλοχολινεστεράσης (AChE), η τακρίνη και η donepezilη κατηγοριοποιούνται ως φάρμακα βραχείας δράσης ή αναστρέψιμα και υδρολύονται μέσα σε λίγα λεπτά. Ως αποτέλεσμα της παρατεταμένης αναστολής του πόνου, η οποία μπορεί να διαρκέσει έως και 10 ώρες, η ριβαστιγμίνη κατηγοριοποιείται ως φάρμακο ενδιάμεσης δράσης ή ψευδο-μη αναστρέψιμη. Οι ασθενείς θα πρέπει να αξιολογούνται κάθε 2-4 εβδομάδες για τους πρώτους μήνες

μετά την έναρξη της θεραπείας με ριβαστιγμίνη, προκειμένου να γίνει προσαρμογή στις δόσεις του φαρμάκου. Στη συνέχεια, πρέπει να αξιολογηθούν μετά από τρεις μήνες και μετά μετά από έξι μήνες. Οι συχνότερες ανεπιθύμητες ενέργειες που καταγράφονται είναι αυτές που σχετίζονται με το πεπτικό σύστημα (Jann, 2000).

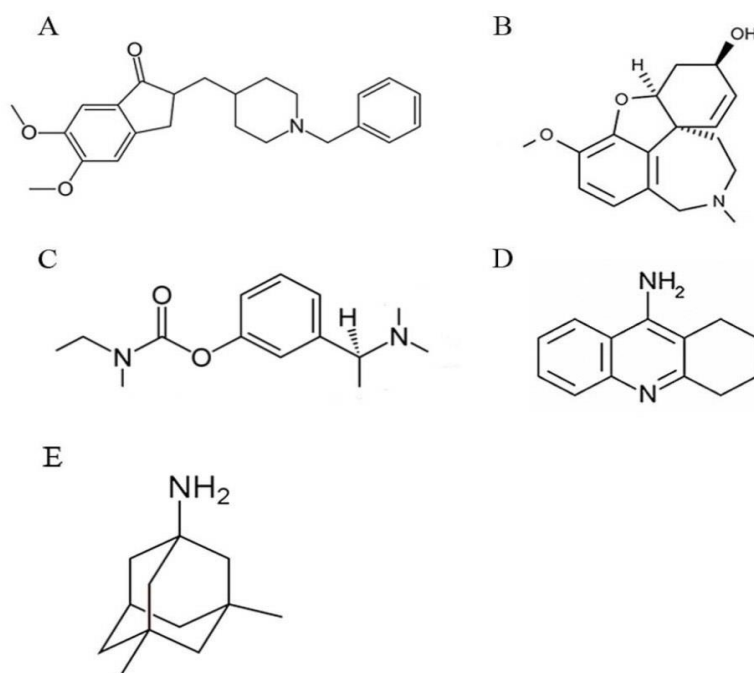
1.4.6.5 MEMANTINΗ (NAMENDA)

Το Memantine (Ebixa ® , Axura ® , Namenda ® , Akatinol ®) είναι ένας εξαρτώμενος από την τάση, μη ανταγωνιστικός, μέτριας συγγένειας ανταγωνιστής του υποδοχέα NMDA που εμποδίζει την υπερβολική εισροή ασβεστίου που προκαλείται από την υπερδιέγερση του υποδοχέα NMDA που συμβαίνει με την πάροδο του χρόνου. Η μεμαντίνη αναστέλλει το κανάλι NMDA με μεγαλύτερη συγγένεια από το ασβέστιο, αλλά με λιγότερη εξάρτηση από την τάση, καθιστώντας την έτσι έναν ανταγωνιστή του ασβεστίου. Το Memantine είναι νευροπροστατευτικό σε *in vitro* και *in vivo* μοντέλα μη φυσιολογικής ενεργοποίησης του υποδοχέα NMDA εμποδίζοντας την υπερβολική είσοδο ασβεστίου μέσω του καναλιού (Robinson & Keating, 2006).

Η μεμαντίνη μπορεί επίσης να προσφέρει άμυνα κατά του διεγερτοτοξικού εκφυλισμού των χολινεργικών νευρώνων. Η αναστολή του υποδοχέα NMBA από το Memantine έχει αποδειχθεί ότι μειώνει την εξαρτώμενη από τον υποδοχέα NMDA διεγερτοτοξικότητα, η οποία έχει εμπλακεί στη σταδιακή απώλεια νευρώνων που αποτελεί τη βάση της προοδευτικής άνοιας. Αυτή η διεγερτοτοξικότητα έχει συνδεθεί με την AD και έχει αποδειχθεί ότι είναι τροποποιητική της νόσου. Εν τω μεταξύ, η *in vitro* έρευνα δείχνει ότι η μεμαντίνη μειώνει την τοξικότητα του β-αμυλοειδούς (Αβ) και θα μπορούσε ακόμη και να σταματήσει τη σύνθεση Αβ (Rogawski & Wenk, 2006).

Το Memantine έχει λάβει άδεια για τη θεραπεία ατόμων με ήπια έως μέτρια άνοια τύπου Alzheimer's στις ΗΠΑ και την ΕΕ. Η μεμαντίνη που λαμβάνεται από το στόμα έχει 100% απόλυτη βιοδιαθεσιμότητα. Κατά τη διάρκεια κλινικών μελετών, η μεμαντίνη ήταν γενικά καλά αποδεκτή και είχε ευνοϊκό προφίλ ασφάλειας, με την πλειονότητα των ανεπιθύμητων ενεργειών να είναι ήπιας έως μέτριας έντασης. Ως

αποτέλεσμα, συνδέθηκε με αυξημένο κίνδυνο υπνηλίας, κεφαλαλγίας, δυσκοιλιότητας και ζάλης (Robinson & Keating, 2006).



Εικόνα 15: Χημική δομή των FDA-εγκεκριμένων φαρμάκων για την AD. Α) Δονεπεζύλη, Β) Γαλανταμίνη, Γ) Ριβαστιγμίνη, Δ) Τακρίνη, Ε) Μεμαντίνη (Ansari & Khodagholi, 2013).

1.5 ΝΕΥΡΩΚΕΦΥΛΙΣΤΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΚΑΙ ΔΥΣΚΟΛΙΑ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ

Η νόσος του Alzheimer's (AD), η νόσος του Parkinson (PD) και η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (ALS) είναι παραδείγματα νευροεκφυλιστικών ασθενειών που χαρακτηρίζονται από τη σταδιακή απώλεια συγκεκριμένων πληθυσμών νευρωνικών κυττάρων και συνδέονται με τη συσσωμάτωση πρωτεϊνών. Εκτεταμένες ενδείξεις οξειδωτικού στρες, που μπορεί να ευθύνονται για τη δυσλειτουργία ή το θάνατο νευρωνικών κυττάρων και που συμβάλλουν στην αιτιολογία της νόσου, είναι χαρακτηριστικό αυτών των διαταραχών (Barnham, Masters, & Bush, 2004). Ορισμένες γενετικές παραλλαγές και η προχωρημένη ηλικία

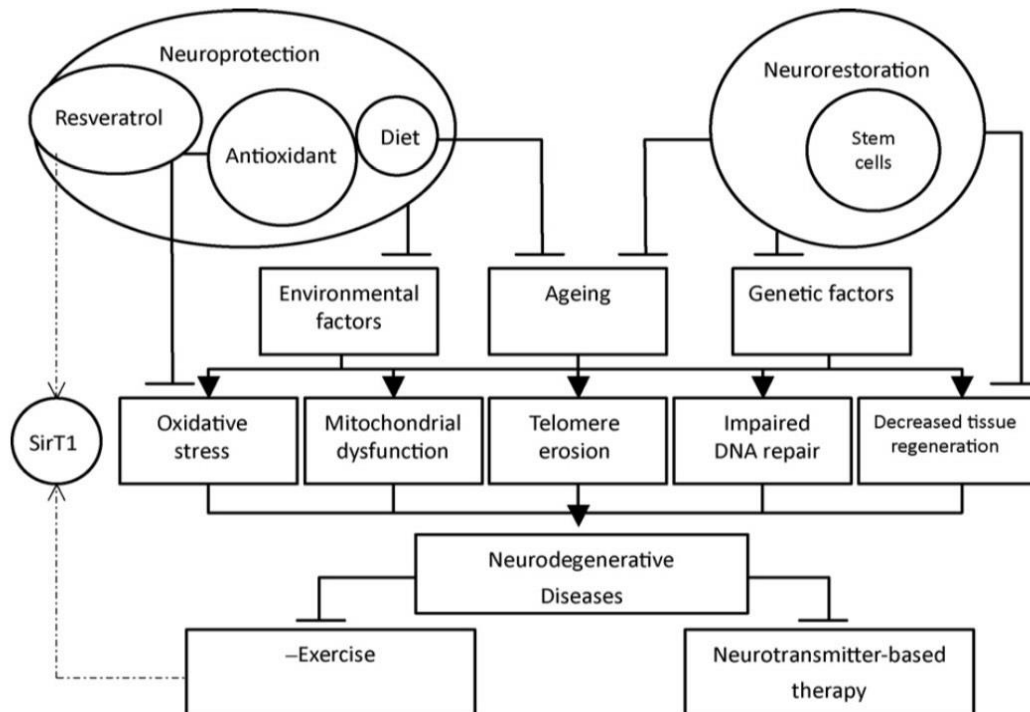
είναι γνωστοί παράγοντες κινδύνου για νευρολογικές διαταραχές. Το φύλλο, η ανεπαρκής εκπαίδευση, οι ενδοκρινικές διαταραχές, το οξειδωτικό στρες, η φλεγμονή, το εγκεφαλικό επεισόδιο, η υπέρταση, ο διαβήτης, το κάπνισμα, οι εγκεφαλικοί τραυματισμοί, η κατάθλιψη, οι λοιμώξεις, οι όγκοι, οι ανεπάρκειες των βιταμινών, οι ανοσολογικές και μεταβολικές διαταραχές και η έκθεση σε χημικά είναι μερικοί πιο πιθανοί λόγοι. Πρέπει να λάβουμε υπόψη τον αντίκτυπο των περιβαλλοντικών παραγόντων σε αυτές τις ασθένειες, διότι η παθοφυσιολογία πολλών από αυτές τις ασθένειες είναι ακόμη ασαφής (Brown, Lockwood, & Sonawane, 2005). Επιπλέον, η αξιοπιστία της διάγνωσης είναι απαραίτητη, καθώς επιτρέπει ακριβέστερη πρόγνωση και οδηγεί σε συγκεκριμένη διαχείριση και θεραπεία.

Επί του παρόντος δεν υπάρχει γνωστή θεραπεία για νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Μόνο συμπτωματικές θεραπείες, ή εκείνες που μπορούν να μειώσουν τα συμπτώματα μιας νόσου χωρίς να σταματήσουν ή να καθυστερήσουν την πορεία της, είναι διαθέσιμες. Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία των συμπτωμάτων της νόσου του Πάρκινσον (PD) έχουν σημαντικό αντίκτυπο, καθώς μειώνουν ή αποκαθιστούν τη δυσκαμψία, τη βραδυκινησία (επιβράδυνση της κίνησης) και το κούνημα. Κατά τους πρώτους μήνες ή χρόνια, υπάρχουν περισσότερα θετικά αποτελέσματα αλλά, καθώς η ασθένεια εξελίσσεται, ο αντίκτυπος των φαρμάκων μειώνεται, οδηγώντας σε πολύ κακή ποιότητα ζωής των ασθενών.

Η αποτελεσματικότητα της συμπτωματικής θεραπείας για ήπια ή μέτρια ασθένεια AD στην ανάκτηση μνήμης και άλλων γνωστικών ικανοτήτων είναι οριακή. Ένα άλλο μειονέκτημα των συμπτωματικών φαρμάκων είναι ότι μερικές φορές αντιμετωπίζουν μόνο ένα μόνο σύμπτωμα των ασθενειών, που συχνά εκδηλώνουν διάφορα συμπτώματα λόγω της ανάπτυξης διαφόρων συστημάτων νευροδιαβιβαστών και περιοχών του κεντρικού νευρικού συστήματος. Είναι προφανές ότι η συμπτωματική θεραπεία από μόνη της είναι ανεπαρκής για τη θεραπεία νευροεκφυλιστικών ασθενειών λόγω της πολυπλοκότητάς τους. Κατά συνέπεια, ο στόχος θα ήταν να αναπτυχθεί ένα φάρμακο τροποποίησης της νόσου που μπορεί να επιβραδύνει σημαντικά ή, ακόμα καλύτερα, να σταματήσει την πορεία της νόσου. (Stanzione & Tropepi, n.d.).

Άλλες σύγχρονες προσεγγίσεις θεραπείας για νευροεκφυλιστικές ασθένειες επικεντρώνονται σε νευροδιαβιβαστές, όπως η ντοπαμίνη για τη νόσο του Πάρκινσον και η ακετυλοχολίνη για τη νόσο του Αλτσχάιμερ. Αν και αυτές οι θεραπείες μπορούν

σαφώς να μειώσουν τα συμπτώματα, δεν μπορούν να αλλάξουν τον τρόπο με τον οποίο αναπτύσσεται μια ασθένεια. Για να βελτιωθεί η πρόγνωση των νευροεκφυλιστικών ασθενειών, απαιτούνται νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις όπως η νευροπροστασία ή η νευροαποκατάσταση. Μια εναλλακτική πηγή κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων νευρώνων, παρέχεται μέσω ανάπτυξης σε βλαστοκύτταρα. Ως αποτέλεσμα, οι κατεστραμμένοι νευρώνες, όπως οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες που αναπτύσσονται στο PD, αντικαθίστανται (Hung, Chen, Hsieh, Chiou, & Kao, 2010). Επιπλέον, οι αναστολείς της χολινεστεράσης έχουν βελτιώσει σταθερά τα συμπτώματα συμπεριφοράς της νόσου του Αλτσχάιμερ. Αυτά πρέπει να ξεκινήσουν νωρίτερα από άλλες φαρμακευτικές θεραπείες, καθώς μειώνουν τις αλλαγές συμπεριφοράς και αναβάλλουν τη γνωστική και λειτουργική βλάβη. Η πιο πιθανή βελτίωση είναι στα νευροψυχιατρικά σημεία και συμπτώματα όπως απάθεια, θλίψη και ανώμαλη κινητική συμπεριφορά. Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες, οι αναστολείς της χολινεστεράσης μπορούν να βελτιώσουν τις γνωστικές επιδόσεις και τα προβλήματα συμπεριφοράς σε ασθενείς με νόσο του Πάρκινσον (Baquero, 2015).



Εικόνα 16: Οι διαδικασίες που συμβάλλουν στο σχηματισμό νευροεκφυλιστικών ασθενειών (Hung, Chen, Hsieh, Chiou, & Kao, 2010).

1.6 ΦΥΣΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΩΣ ΤΡΟΠΟΣ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Το Αλτσχάιμερ είναι μια σύνθετη ασθένεια που επηρεάζεται τόσο από κληρονομικούς όσο και από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η βέλτιστη παροχή θρεπτικών συστατικών που απαιτούνται για τη διατήρηση της σωστής λειτουργίας του εγκεφάλου είναι ένα κρίσιμο συστατικό για την υγεία και τη λειτουργία των νευρώνων (Cordero, García-Escudero, Avila, Gargini, & García-Escudero, 2018). Μια άλλη στρατηγική για την επιβράδυνση της γήρανσης του εγκεφάλου και την πρόληψη της ανάπτυξης παθολογίας AD είναι η χρήση βιταμινών στους ηλικιωμένους και σε άτομα που διατρέχουν κίνδυνο (Sijtsma & de Swaaf, 2004). Δεδομένου ότι η διατροφή μπορεί να μειώσει την πιθανότητα εμφάνισης άνοιας, έχουν καταβληθεί προσπάθειες για τον εντοπισμό τροφίμων που μπορούν να αποτρέψουν τη γνωστική απώλεια (Cordero, García-Escudero, Avila, Gargini, & García-Escudero, 2018). Τα βιοδραστικά συστατικά των φυσικών προϊόντων είναι ζωτικής σημασίας για την πρόληψη και τη θεραπεία ορισμένων νευροεκφυλιστικών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένης της νόσου του Πάρκινσον, της νόσου του Αλτσχάιμερ και άλλων νευρωνικών δυσλειτουργιών. Οι κύριες μοριακές διεργασίες που υποκρύπτουν τα θεραπευτικά οφέλη εξαρτώνται από το πώς αλληλεπιδρούν τα φυτοθρεπτικά συστατικά με διάφορες οδούς σηματοδότησης που συνδέονται με νευροφλεγμονή και αναδίπλωση πρωτεϊνών (Essa et al., 2012).

Για την αποτελεσματική χορήγηση φαρμάκων, πρέπει να ληφθούν υπόψη διάφοροι παράγοντες κατά το σχεδιασμό νέων θεραπειών για νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Το να μπορείς να διασχίσεις τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό είναι μια από τις πιο κρίσιμες ικανότητες (BBB). Ένα φάρμακο ή μια ουσία πρέπει πρώτα να διασχίσει το BBB για να επιτύχει τους στόχους του φαρμάκου (Banks, 2009). Για να έχουν οι φυσικές ουσίες νευροπροστατευτική δράση, πρέπει να είναι σε θέση να περάσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Έτσι, η ικανότητά τους να διασχίζουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό επηρεάζεται σημαντικά από τη λιποφιλικότητα και το φορτίο πολυφαινόλης (BBB). Ενώ ορισμένες αντιοξειδωτικές φαινόλες στοχεύουν το ραβδωτό σώμα, άλλες λειτουργούν στον υπόκαμπο του εγκεφάλου. Η ενίσχυση της έκφρασης των αντιοξειδωτικών ενζύμων και η μείωση της έκφρασης των αποπτωτικών γονιδίων είναι οι στόχοι του μηχανισμού που διέπει τη νευροπροστατευτική δραστηριότητα (Essa et al., 2012).

Επιπλέον, μία από τις θεραπείες για το AD είναι η χορήγηση αντιοξειδωτικών. Τα αντιοξειδωτικά είναι ουσίες που βοηθούν στη μείωση της βλάβης ROS, η οποία αναπτύσσεται ως αποτέλεσμα του οξειδωτικού στρες και μπορεί να είναι επιτυχής στην αναβολή και αποφυγή της εμφάνισης αντιοξειδωτικών αντιδράσεων ελεύθερων ριζών. Τα αντιοξειδωτικά που μπορούν να αποικοδομήσουν εσωτερικές και εξωτερικές ρίζες υπεροξειδίου, υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) και χημικές ουσίες που καταστρέφουν τα κύτταρα που δημιουργούνται από φυσιολογικές διεργασίες περιλαμβάνουν λιποϊκό οξύ (ή τειχοϊκό οξύ), βιταμίνες C, E και β-καροτένιο. Οι κατηγορίες αυτών είναι οι εξής : 1) φυσικά αντιοξειδωτικά (όπως πολυφαινόλες φυτικής προέλευσης), 2) συνθετικά αντιοξειδωτικά (όπως βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο), 3) βιταμίνες (όπως C, A και E) και 4) ανόργανα στοιχεία (όπως σελήνιο) (Noori, Dehpour, Sureda, Sobarzo-Sanchez, & Shirooie, 2021).

Σημαντικές βιοδραστικές ουσίες που βρίσκονται σε φρούτα, μπαχαρικά, ξηρούς καρπούς και βότανα χρειάζονται για τη θεραπεία και την πρόληψη νευροεκφυλιστικών ασθενειών (Essa et al., 2012). Πιο συγκεκριμένα, οι αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, αντι-αμυλοειδογόνες και αντι-χολινεστερασικές δραστηριότητες των φλαβονοειδών, του τζίντζερ, των τανινών, των ανθοκυανινών, των τριτερπενίων και των αλκαλοειδών έχουν τεκμηριωθεί (Noori, Dehpour, Sureda, Sobarzo-Sanchez, & Shirooie, 2021). Επιπλέον, τα αντιοξειδωτικά ρεσβερατρόλη από σταφύλια, κουρκουμίνη από κουρκούμη και γαλλική επικατεχίνη (ECG) από τσάι παρουσιάζουν επιπλέον αντι-αμυλοειδογόνο δράση.

Ως αποτέλεσμα, τα φαρμακευτικά βότανα αποτελούν σημαντική πηγή χημικών ουσιών κατά της AD. Μια ποικιλία πιθανών νευροπροστατευτικών ενώσεων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συστατικά σε φαρμακευτικά προϊόντα (Ansari & Khodagholi, 2013) έχουν βρεθεί χρησιμοποιώντας τη δομή αυτών των δραστικών συστατικών ως πρότυπα. Ορισμένες από αυτές τις ουσίες παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 1) μαζί με τις αντίστοιχες μεθόδους δράσης τους.

Αποτελεσματικό υλικό	Πηγή	Μηχανισμός	Βιοδιαθεσιμότητα
Φαινόλες	Ρόδι, Ελαιόλαδο	1) Μειώνει το χρόνιο οξειδωτικό στρες 2) Βελτίωση της μνήμης και του άγχους	-
Απιγενίνη	Τσάι και σέλινο	Βελτίωση της μνήμης και της μάθησης και μείωση της συσσώρευσης ινώδους αμυλοειδούς	Χαμηλή διαλυτότητα και υψηλή εντερική διαπερατότητα
Αλκαλοειδή	Huperzine A	1) Μειώνει τη συσσώρευση πλάκας 2) Βελτιώνει τη μιτοχondριακή λειτουργία 3) Αναστέλλει τη δραστηριότητα της ακετυλοχολινεστεράσης	Ταχεία απορρόφηση Ευρεία διανομή Χαμηλή αποβολή

Κουρκουμίνη	Κουρκουμά	Βελτίωση των συμπτωμάτων μειώνοντας τον αριθμό πλακών αμυλοειδούς	Χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα
Ρεσβερατρόλη	Σταφύλια και μουριές	Μειώνει τη συσσώρευση της πλάκας Αβ και ενεργοποιεί τα μικρογλοία στον υποκάμπο και τον φλοιό	Καλή απορρόφηση Ταχεία αποβολή
Μπερμπερίνη	Berberis, Rhizoma coptidis or Mahonia aquifolium	Μειώνει τη συσσώρευση αμυλοειδούς πλάκας και προκαλεί μείωση της φαινοτυπικής παθολογίας AD	Χαμηλή απορρόφηση
Καφεΐνη	Καφές	Μειώνει τη φωσφορυλίωση του, τους προ φλεγμονώδεις και οξειδωτικούς δείκτες στρες	-
Κατεχίνη	Τσάι	Αναστέλλει την ινιδιογένεση της Αβ	Ημιζωή: 3 ώρες
DHA	Θαλασσινή άλγη	Αποτρέπει τη γνωστική εξασθένηση που σχετίζεται με την ηλικία	-
Λουτεολίνη	Μπρόκολο	1) Μειώνει την οξειδωτική πίεση, δραστηριότητα πόνου, και συσσώρευση πεπτιδίων Αβ42 2) Αναστολή της ROS	Εντερική σύζευξη και το ηπατική θείωση / μεθυλίωση
Κερσετίνη	Μήλα και κρεμμύδια	1) Μειώνει το οξειδωτικό στρες και αυξάνει τη γνωστική λειτουργία 2) Μείωση του εξωκυτταρικού Αβ	Ημιζωή: 11-28 ώρες

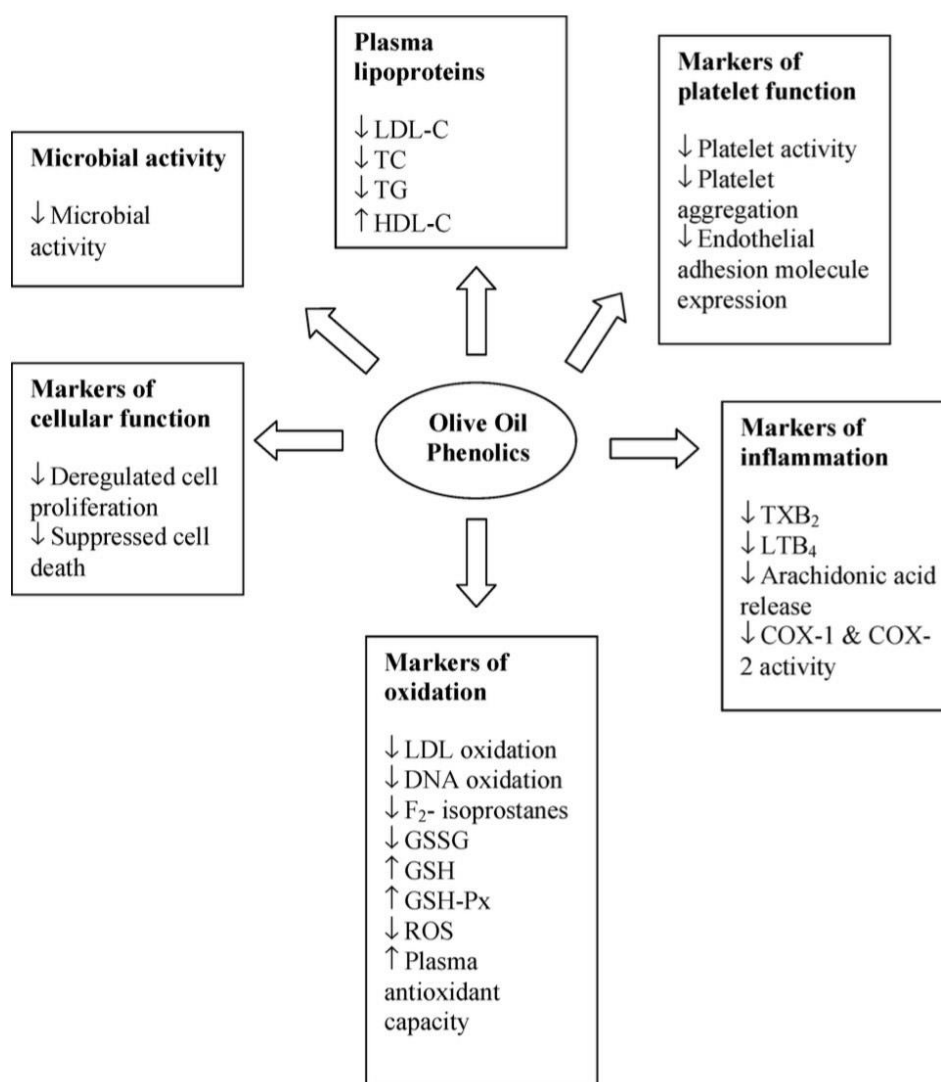
Πίνακας 1: Επιδράσεις των φυσικών προϊόντων στη θεραπεία της νόσου του Αλτσχάιμερ (Ansari & Khodagholi, 2013) (Noori, Dehpour, Sureda, Sobarzo-Sanchez, & Shirooie, 2021)

1.6.1 ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΣ

Η ελαιοευρωπαϊνή και η υδροξυτυροσόλη είναι δύο παραδείγματα των σημαντικών επιπέδων φαινολικών αντιοξειδωτικών χημικών ουσιών που υπάρχουν στις ελιές. Το κύριο αντιοξειδωτικό, η ελευρωπαϊνή, είναι αυτό που δίνει στον ελαιόκαρπο την πικρή γεύση του (Sueishi & Nii, 2020). Ο ελαιόκαρπος περιέχει συνήθως 22% λάδι, 50% νερό και το υπόλοιπο 19% αποτελείται από υδατάνθρακες(πηκτίνη, κυτταρίνη (6%) και ημικυτταρίνες), πρωτεΐνες, μέταλλα, καθώς και πτητικές χημικές ουσίες όπως αλδεΐδες, αλκοόλες, εστέρες, υδρογονάνθρακες, κετόνες και φουράνια. Ο ελαιόκαρπος περιλαμβάνει επίσης υδρόφιλες βιοδραστικές ουσίες όπως φαινόλες (1% -3%) και λιπόφιλες βιοδραστικές ουσίες, όπως σκουαλένιο (0,48% λάδι), β-σιτοστερόλη (0,27% λάδι) και α-τοκοφερόλη (0,028% λάδι) και χρωστικές ουσίες (χλωροφύλλη και καροτενοειδή).

Τα βιοδραστικά συστατικά είναι ενώσεις που απαντώνται κυρίως σε φυτά που είναι είτε απαραίτητα (βιταμίνες) είτε μη απαραίτητα (πολυφαινόλες) που έχουν αντίκτυπο στην ανθρώπινη υγεία (αντιοξειδωτικά, αντιμικροβιακά, αντικαρκινικά, αντιφλεγμονώδη). Η πλειοψηφία των βιοδραστικών συστατικών στο ελαιόκαρπο (1% -3%, w/w) είναι φαινολικές ενώσεις (Seçmeler & Galanakis, 2019). Γενικά,

υπάρχουν τέσσερις τύποι φαινολικών χημικών ουσιών που βρίσκονται στις ελιές: φαινολικά οξέα, φαινολικές αλκοόλες, φλαβονοειδή και σεκοϊριδοειδή. Αυτές οι ουσίες είναι ζωτικής σημασίας για το προφίλ γεύσης, τα οφέλη για την υγεία, το χρώμα και την ανθεκτικότητα των ελιών (Johnson & Mitchell, 2018). Επιπλέον, οι κύριες ουσίες που βρίσκονται στους καρπούς της ελιάς περιλαμβάνουν ανθοκυανίνες (γλυκοσίδες κυανιδίνης και δελφινιδίνης), φλαβονόλες (κυρίως κουερσετίνη-3-ρουτινοσίδα), φλαβόνες(γλυκοσίδες λουτεολίνης και απιγενίνης), φαινολικά οξέα (υδροξυβενζοϊκά, υδροξυκινναμικά), φαινολικές αλκοόλες (τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη), σεκοϊριδοειδή (oleuropein, dimethyloleuropein, ligstroside, nuzhenide), και βερβασκοσίδα, ένα παράγωγο υδροξυκινναμικού οξέος (Boskou, Camposeo, & Clodoveo, 2015).



Εικόνα 17: Βιολογικές δραστηριότητες φαινολικών ενώσεων ελαίου της ελιάς (Cicerale, Conlan, Sinclair, & Keast, 2008).

1.6.2 ΒΙΤΑΜΙΝΗ Ε

Ένα διατροφικό συστατικό που ονομάζεται βιταμίνη Ε λειτουργεί ως φυσικό αντιοξειδωτικό που εξουδετερώνει τις επικίνδυνες ελεύθερες ρίζες και προστατεύει τα ακόρεστα λιπαρά οξέα από την αποικοδόμηση των λιπιδίων (Grundman, 2000). Το ενδιαφέρον για τη χρήση της βιταμίνης Ε στη θεραπεία της νόσου του Alzheimer's και της μέτριας γνωστικής εξασθένησης (MCI) έχει αυξηθεί ως αποτέλεσμα της απόδειξης ότι οι ελεύθερες ρίζες μπορεί να συμβάλλουν σε παθολογικές διεργασίες γνωστικής εξασθένησης, συμπεριλαμβανομένης της νόσου του Alzheimer's (AD). Επιπλέον, καθυστερεί τις απώλειες μνήμης και σταματά την οξειδωτική βλάβη που προκαλείται από το β-αμυλοειδές στην κυτταρική καλλιέργεια

Η τοκοφερόλη και η τοκοτριενόλη είναι δύο φυσικές χημικές ενώσεις που αναφέρονται μαζί ως βιταμίνη Ε. Για ιατρικές χρήσεις, η α-τοκοφερόλη είναι η προτιμώμενη μορφή. Τα έλαια και τα λίπη, οι ξηροί καρποί και άλλοι σπόροι και ένα ευρύ φάσμα ζωικών τροφών, περιέχουν όλα βιταμίνη Ε (Farina, Isaac, Clark, Rusted, & Tabet, 2012). Η διάσπαση του διαιτητικού λίπους βοηθά στην απορρόφηση της βιταμίνης Ε. Επιπλέον, η βιταμίνη Ε μεταφέρεται στο αίμα σε συνδυασμό με λιποπρωτεΐνες, δηλαδή LDL και HDL. Τα επίπεδα βιταμίνης Ε στο φυσιολογικό πλάσμα κυμαίνονται από 11,6 έως 30,8 mmol/L.

Μέσω μιας διαδικασίας που περιλαμβάνει οξειδωτικό στρες και υπεροξειδίου του υδρογόνου, το β-αμυλοειδές μπορεί να προκαλέσει κυτταροτοξικότητα. Η παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου και η κυτταροτοξικότητα που ακολουθεί μπορούν να προληφθούν από τη βιταμίνη Ε. Επιπλέον, συζευγμένα ελικοειδή νημάτια κατασκευασμένα από μικροσωληνίσκους και μια μεταλλαγμένη έκδοση της πρωτεΐνης tau αποτελούν νευροϊνιδιακά μπερδέματα. Η πρωτεΐνη Tau είναι ιδιαίτερα φωσφορυλιωμένη και γλυκοζυλιωμένη μέσα σε ζευγαρωμένα ελικοειδή νήματα. Η γλυκοζυλίωση, η οξείδωση και ο σχηματισμός ελεύθερων ριζών συμβάλλουν στην μη αναστρέψιμη διασύνδεση πρωτεϊνών συμπεριλαμβανομένου του β-αμυλοειδούς και του tau. Η βιταμίνη Ε και άλλα αντιοξειδωτικά μπορεί να είναι σε θέση να σταματήσουν αυτή τη διασταύρωση (Grundman, 2000).

Εκτός από το ρόλο της ως αντιοξειδωτικό, η βιταμίνη Ε υποστηρίζει μια σειρά άλλων βιολογικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένης της γονιδιακής έκφρασης και του ελέγχου ενζύμων όπως η πρωτεϊνική κινάση C, η οποία είναι ζωτικής σημασίας

για τη ρύθμιση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων καθώς και για την εμφάνιση φλεγμονωδών αποκρίσεων (Abubakar et al., 2022).

Τα συμπληρώματα διατροφής μπορούν να αυξήσουν τα επίπεδα βιταμίνης E στον εγκέφαλο (Grundman, 2000). Οι διεθνείς μονάδες (IUs), οι οποίες χρησιμοποιούνται συνήθως για τον ποσοτικό προσδιορισμό των δόσεων βιταμίνης E, είναι ίσες με 0,67 mg α-τοκοφερόλης ανά IU. Οι άνδρες πρέπει να καταναλώνουν 15 IU (10 mg α-τοκοφερόλης) την ημέρα, ενώ οι γυναίκες πρέπει να καταναλώνουν 12 IU (8 mg α-τοκοφερόλης), με τη συνιστώμενη ημερήσια ποσότητα να αυξάνεται στα 15 IU κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Πάνω από 3000 IU βιταμίνης E την ημέρα είναι επιβλαβής και μπορεί να οδηγήσει σε πόνους στο στομάχι και διάρροια (Farina, Isaac, Clark, Rusted, & Tabet, 2012).

1.6.3 ΕΛΕΥΡΩΠΑΪΝΗ ΚΑΙ ΦΑΙΝΟΛΕΣ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

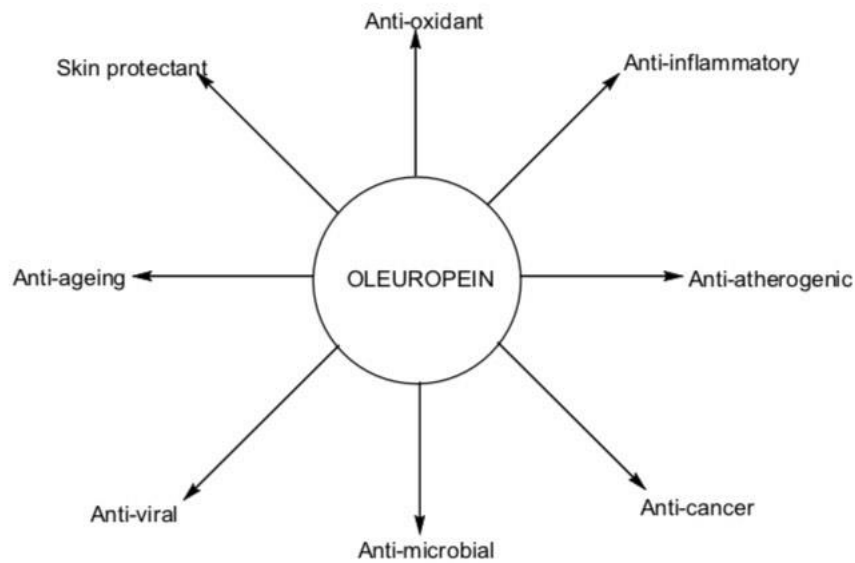
Τα πολυάριθμα πλεονεκτήματα της Μεσογειακής Διατροφής για την ψυχική υγεία πιστεύεται ότι οφείλονται στις φαινόλες, οι οποίες αποτελούν αντικείμενο αρκετών ερευνών. Μια ευρεία οικογένεια μη ενεργειακών ενώσεων που βρίσκονται σε φυτικές τροφές που ονομάζονται πολυφαινόλες κατηγοριοποιούνται με βάση τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων που περιέχουν και ορίζονται από την παρουσία ενός ή περισσότερων φαινολικών δακτυλίων (Cordero, García-Escudero, Avila, Gargini, & García-Escudero, 2018). Έχουν αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές, αντιβακτηριακές, αντι-ιικές, αντι-αθηρογόνες, υπογλυκαιμικές, ηπατικές-καρδιακές και νευροπροστατευτικές ιδιότητες. Η κατανάλωση παρθένου ελαιολάδου μη επεξεργασμένου είναι απαραίτητη προκειμένου οι άνθρωποι να απορροφήσουν ένα σημαντικό μέρος των προσλαμβανόμενων φαινολών του ελαιολάδου (Barbaro et al., 2014).

Η οξειδωτική βλάβη, ιδιαίτερα στα μιτοχόνδρια, προκαλεί γήρανση. Η κυτταρική δυσλειτουργία προκύπτει από οξειδωτική βλάβη που δεν μπορεί να εξαιρεθεί πλήρως. Επειδή οι μιτοχονδριακές μεμβράνες είναι τόσο ευάλωτες στη βλάβη των ελεύθερων ριζών, μπορούν να αναπτυχθούν γνωστικές και νευροεκφυλιστικές διαταραχές. Πρέπει επομένως να αναφερθεί η ευεργετική

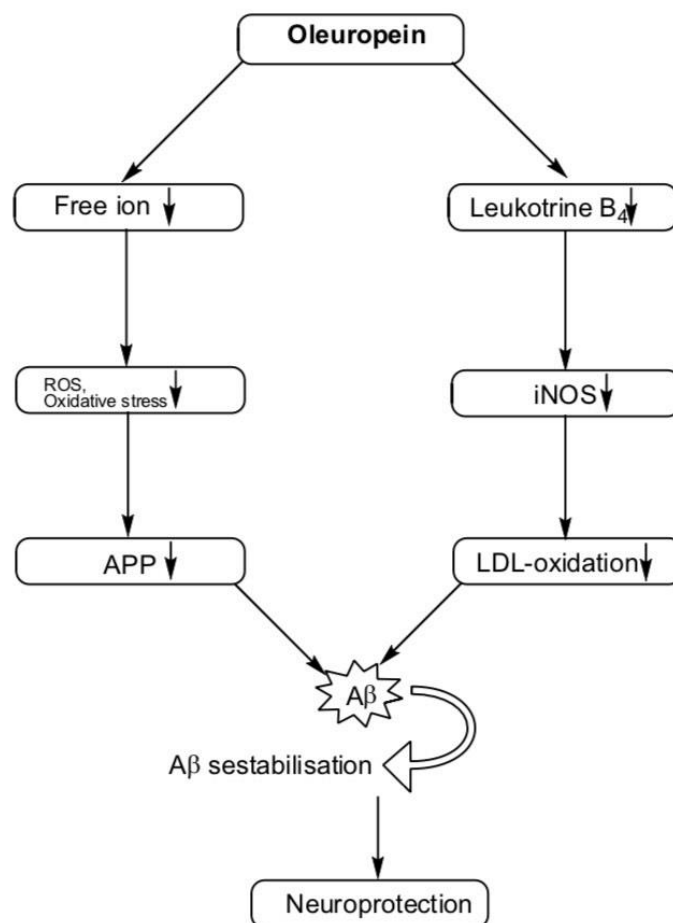
επίδραση των πολυφαινολών φυσικής προέλευσης στον επιπολασμό ασθενειών που σχετίζονται με την ηλικία, συμπεριλαμβανομένης της άνοιας (Haris Omar, 2010).

Το ελαιόλαδο και τα φύλλα ελιάς περιέχουν την πολυφαινόλη ελευρωπαΐνη (Sun, Frost, & Liu, 2017). Το πιο διαδεδομένο φαινολικό συστατικό, είναι η χημική ουσία που δίνει στις ωμές ελιές τη χαρακτηριστική πικρή γεύση τους. Η ποσότητα της ελαιοευρωπαΐνης στις ελιές επηρεάζεται σημαντικά από το είδος της ελιάς και τη μέθοδο που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία βρώσιμων ελιών (Barbaro et al., 2014). Συνήθως, ο καρπός της ελιάς αναπτύσσεται σε τρία στάδια, καθένα από τα οποία επηρεάζει την ποσότητα της ελευρωπαΐνης που υπάρχει. Αρχικά, μελετάμε το στάδιο ανάπτυξης, όταν λαμβάνει χώρα η συσσώρευση ελαιοευρωπαΐνης. Στη συνέχεια έρχεται η πράσινη φάση ωρίμανσης, η οποία ορίζεται από την πτώση των επιπέδων χλωροφύλλης και ελαιοευρωπαΐνης, και τέλος η μαύρη φάση ωρίμανσης, η οποία χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση ανθοκυανινών και τη συνέχιση της μείωσης των επιπέδων ελαιοευρωπαΐνης (Haris Omar, 2010).

Η ισχυρή αντιοξειδωτική δράση της ελαιοευρωπαΐνης και του μεταβολίτη της, της υδροξυτυροσόλης, μπορεί να είναι η αιτία μέρους των αντιφλεγμονωδών και αντιοξειδωτικών επιδράσεων του ελαιολάδου καθώς και του ρόλου του στην πρόληψη ασθενειών. Η ολεουροπεΐνη επίσης έχει αποδειχθεί ότι είναι μια χημική ουσία με θεραπευτικό δυναμικό της νόσου του Αλτσχάιμερ (Sun, Frost, & Liu, 2017). Η εναπόθεση πλάκας αμυλοειδούς, το καθοριστικό χαρακτηριστικό της νόσου του Αλτσχάιμερ, τονίζεται από την ανώμαλη σύνθεση Αβ, η οποία προκύπτει από διασπάσεις β- και γ-σεκρετάσης της προδρομίου πρωτεΐνης αμυλοειδούς και επακόλουθη συσσωμάτωση της. Η ελαιοευρωπαΐνη έχει πράγματι αναγνωριστεί ως ένα μη ομοιοπολικό μόριο δέσμευσης αμυλοειδούς-β (Αβ) που αναστέλλει το σχηματισμό και την εναπόθεση αμυλοειδούς πλάκας και έτσι αποτρέπει την επιβλαβή συσσωμάτωση του αμυλοειδούς β. Η ολεουροπεΐνη αναστέλλει επίσης το tau, έναν μικροσωληνίσκο που σχετίζεται με μια πρωτεΐνη που είναι γνωστό ότι παράγει ασυνήθιστα συσσωματώματα αμυλοειδούς που είναι ενδεικτικές της νόσου του Alzheimer's (Barbaro et al., 2014).



Εικόνα 18: Φαρμακολογικές επιδράσεις της ελαιευρωπαϊνης (Haris Omar, 2010).



Εικόνα 19: Διαγραμματική αναπαράσταση του νευροπροστατευτικού ρόλου της ελευρωπαϊνης (Haris Omar, 2010).

1.6.4 ΩΜΕΓΑ-3 (DHA FATTY ACID)

Το Ωμέγα-3 πολυακόρεστο λιπαρό οξύ (DHA) είναι γνωστό ότι είναι μια ισχυρή θεραπεία για τη νόσο του Alzheimer's (Quinn et al., 2010). Αποτελεί το 30% των λιπιδίων στον ανθρώπινο εγκέφαλο και είναι ένα σημαντικό ωμέγα-3 λιπαρό οξύ που είναι το κύριο συστατικό των νευρωνικών μεμβρανών. Το DHA μπορεί επίσης να ληφθεί με διατροφή από θαλάσσια είδη (Patrick, 2018), όπως το ιχθυέλαιο, το οποίο είναι η μεγαλύτερη πηγή DHA, ή συνθετικά από φυτικά παράγωγα ωμέγα-3 λιπαρών οξέων (Sijtsma & de Swaaf, 2004).

Το DHA μεταβολίζεται διαφορετικά ανάλογα με το αν είναι σε φωσφολιπιδική μορφή (δηλαδή, ψάρια, αυγοτάραχο και λάδι κριλ), μορφή τριγλυκεριδίων (δηλαδή, ψάρια και μερικά συμπληρώματα DHA), μορφή ελεύθερου λιπαρού οξέος (δηλαδή, τα περισσότερα συμπληρώματα DHA), ή αιθυλο μορφή εστέρα (δηλαδή, τα περισσότερα συμπληρώματα DHA). Τα συμπληρώματα ιχθυελαίου δεν περιλαμβάνουν DHA σε μορφή φωσφολιπιδίου, αλλά τα ψάρια περιέχουν 1,0–1,5% ωμέγα-3 λιπαρά οξέα σε μορφή φωσφολιπιδίου. Ιδιαίτερα το αυγοτάραχο, το οποίο έχει περιεκτικότητα σε DHA 38-75%, είναι μία από τις πιο συγκεντρωμένες πηγές DHA σε μορφή φωσφολιπιδίων. Γενικά, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, οι αιθυλεστέρες και, σε μικρότερο βαθμό, τα εστεροποιημένα τριγλυκερίδια είναι οι τρεις κύριες μορφές DHA που βρίσκονται στα συμπληρώματα ιχθυελαίου (Patrick, 2018). Επιπλέον, πολλά κρίσιμα λιπαρά οξέα, όπως λιπαρά οξέα DHA, υπάρχουν στα φύκια. Εκτός από άλλες βιοδραστικές ενώσεις, οι πολυφαινόλες, οι πολυσακχαρίτες και οι στερόλες ευθύνονται κυρίως για τις ευεργετικές ιδιότητες που αποδίδονται στα φύκια. Αυτές οι χημικές ουσίες λέγεται ότι έχουν αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές και αντιδιαβητικές επιδράσεις. Τα φύκια λοιπόν έχουν συνδεθεί με μια σειρά νευροπροστατευτικών οφελών στη νόσο του Alzheimer's (Peñalver et al., 2020).

Η πιθανή επίδραση ορισμένων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs), ιδιαίτερα του εικοιδυαεξανοϊκού οξέος (DHA), στη μείωση της κατάλληλης λειτουργίας του εγκεφάλου που προκαλείται από εκφυλιστικές διαταραχές του καρδιαγγειακού συστήματος και νευροεκφυλιστικές ασθένειες της γήρανσης λαμβάνει όλο και περισσότερη προσοχή. Αυτό το λιπαρό οξύ μπορεί να είναι μια πιθανή θεραπεία νευρολογικών διαταραχών, καθώς μπορεί να αλλάξει τον ρυθμό μεταγωγής σήματος (Laurent et al., 2014). Οι μειώσεις που σχετίζονται με την ηλικία

στα επίπεδα DHA του εγκεφάλου, ιδιαίτερα σε ασθενείς με AD, υποδηλώνουν ότι ένα μειωμένο περιεχόμενο DHA μπορεί να είναι ένας παράγοντας στην επιδείνωση της μνήμης και άλλων γνωστικών ικανοτήτων (Mohajeri, Troesch, & Weber, 2015).

Το DHA είναι το πιο διαδεδομένο ωμέγα-3 λιπαρό οξύ στον ανθρώπινο εγκέφαλο, καθώς αποτελεί περίπου το 60% των ακόρεστων λιπαρών οξέων στις νευρωνικές μεμβράνες. Λόγω του ρόλου του στη νευρική ανάπτυξη, τη νευρογένεση και την πρόληψη της συναπτικής απώλειας, η διαχείριση DHA ενισχύει την ικανότητα μάθησης (M. O. W. Grimm, Zimmer, Lehmann, Grimm, & Hartmann, 2013). Σε άτομα με ενδιάμεση άνοια και AD, η συμπλήρωση με DHA μειώνει την ανάπτυξη πλάκας αμυλοειδούς-β, συσσωμάτωση και τοξικότητα. Η συμπλήρωση DHA μειώνει επίσης τα μπερδέματα tau (Patrick, 2018). Το DHA συνδέεται γρήγορα με φωσφολιπίδια στις κυτταρικές μεμβράνες, μεταβάλλοντας τη ρευστότητα της μεμβράνης και συμβάλλοντας στη συναπτική πλαστικότητα, την ανάπτυξη διαύλων ιόντων και τη νευροδιαβίβαση (M. O. W. Grimm, Zimmer, Lehmann, Grimm, & Hartmann, 2013).

1.7 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΗΠΑΡ

Ένα κρίσιμο συστατικό της φαρμακολογίας και της ιατρικής πρακτικής είναι ο μεταβολισμός των φαρμάκων. Τα περισσότερα φάρμακα μεταβάλλονται χημικά από μια ποικιλία φυσιολογικών διεργασιών για την παραγωγή ουσιών που αποβάλλονται πιο εύκολα από το σώμα. Ο όρος "βιομετασχηματισμός" αναφέρεται σε αυτές τις χημικές τροποποιήσεις, οι οποίες λαμβάνουν χώρα κυρίως στο ήπαρ. Η αξιοποίηση της καλύτερης φαρμακευτικής στρατηγικής για κάθε ασθενή εξαρτάται από την πλήρη κατανόηση αυτών των αλλαγών στη χημική δραστηριότητα. (Susa & Preuss, 2022).

Ο χημικός μετασχηματισμός ενός βιολογικού συστήματος ενός φαρμάκου με σκοπό την απορρόφηση και την απέκκρισή του είναι γνωστός ως μεταβολισμός φαρμάκων. Επιπλέον, ο όρος μεταβολισμός αναφέρεται στη μέθοδο με την οποία ένα ένζυμο μετακινεί μόρια από το ένα χημικό τμήμα στο άλλο. Η απομάκρυνση ενδογενών και / ή εξωγενών χημικών ουσιών από το σώμα είναι ο κύριος στόχος του μεταβολισμού (Rustgi, 2016). Μπορούμε να συσχετίσουμε φαρμακολογικά και

τοξικολογικά φαινόμενα με τη φαρμακοκινητική του φαρμάκου και των μεταβολιτών του κατανοώντας πώς μεταβολίζεται ένα φάρμακο. Το ενδοπλασματικό δίκτυο των ηπατικών κυττάρων περιέχει ένζυμα που εμποδίζουν το σώμα να συσσωρεύει λιποδιαλυτές εξωγενείς και ενδογενείς ουσίες, συμπεριλαμβανομένων των φαρμάκων, μετατρέποντάς τα σε μεταβολίτες που εκκρίνονται εύκολα από τα νεφρά.

Ο μεταβολισμός του φαρμάκου αναλύεται σε λειτουργικές αντιδράσεις φάσης I, όπως υδροξυλίωση, οι οποίες προσθέτουν μια πολική λειτουργική ομάδα στο μόριο, και συνθετικά γεγονότα φάσης II, όπως ακετυλίωση και μεθυλίωση, τα οποία χρησιμοποιούν και τις δύο φάσεις διαδοχικά. Οι μεταβολίτες φάσης I μπορεί περιστασιακά να αποβληθούν χωρίς επεξεργασία ή να υποβληθούν σε μεταβολισμό φάσης II πριν από την αποβολή (Herrlinger & Klotz, 2001) (Tolosa et al., 2016). Οι μεταβολές της φάσης I, οι οποίες συνήθως περιλαμβάνουν οξείδωση, αναγωγή, υδρόλυση, κυκλοποίηση /αποκυκλοποίηση και απομάκρυνση υδρογόνου ή προσθήκη οξυγόνου, αλλάζουν τη χημική δομή του φαρμάκου. Ένα αδρανές προφάρμακο μπορεί περιστασιακά να γίνει φάρμακο με μεταβολική δραστηριότητα μέσω αυτής της διαδικασίας. Οι μεταβολές της φάσης II περιλαμβάνουν χημικές διεργασίες που συζεύγουν-ή δεσμεύουν-το μόριο του φαρμάκου σε άλλο μόριο. Η σύζευξη τυπικά καθιστά το μόριο υδατοδιαλυτό και φαρμακολογικά ανενεργό, επιτρέποντας απλή απέκκριση. Η μεθυλίωση, η ακετυλίωση, η θείωση, η γλυκουρονιδίωση και η σύζευξη γλυκίνης ή γλουταθειόνης είναι παραδείγματα μηχανισμών σύζευξης. Αυτές οι διαδικασίες μπορούν να λάβουν χώρα στους πνεύμονες, τα έντερα, το ήπαρ, τα νεφρά και άλλα συστήματα οργάνων (Susa & Preuss, 2022).

Στα μονοπάτια φάσης II, η γλυκουρονιδίωση της διφωσφορικής ουριδίνης (UDP)-γλυκορονοσυλτρανσφεράσες (UGT) στο ενδοπλασματικό δίκτυο ενισχύει τη διαλυτότητα των ουσιών στο νερό και βοηθά στη νεφρική απέκκριση τους (Herrlinger & Klotz, 2001) (Tolosa et al., 2016). Οι μονοξυγενάσες, οι εστεράσες και οι αμιδάσες που βρίσκονται στην υπεροικογένεια ενζύμων του κυτοχρώματος P₄₅₀ (CYP) είναι τα πιο σημαντικά ένζυμα στον μεταβολισμό της Φάσης I. Οι αντιδράσεις παραγοντοποίησης, οι οποίες προσθέτουν πολική λειτουργικότητα στο μητρικό μόριο ή στον μεταβολίτη φάσης I, είναι ο πιο κοινός τύπος αντιδράσεων Φάσης II. Τα συζεύγματα που παράγονται ως αποτέλεσμα της φάσης II είναι συνήθως πιο πολικά από το μητρικό μόριο και επομένως είναι πιο πιθανό να απεκκρίνονται από το σώμα. Οι πιο κοινές μεταβολικές διεργασίες Φάσης II είναι η σύζευξη γλουταθειόνης, η γλυκουρονιδίωση και η θείωση. Τα μέλη της υπεροικογένειας CYP ταξινομούνται σε

πολλές υποοικογένειες με βάση την αλληλουχία αμινοξέων. Οι ισομορφές ταξινομούνται περαιτέρω σε υποοικογένειες. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 1, σημαντικές ισομορφές που εμπλέκονται στο μεταβολισμό φαρμάκων στους ανθρώπους είναι τα CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 και CYP3A4.

Most important CYP-isoforms	Abundance in liver (%) [†]	% of drugs metabolized [‡]
CYP3A4	30	52
CYP2C proteins	20	20
CYP1A2	13	11
CYP2E1	7	7.5
CYP2A6	4	1.2
CYP2D6	2	25
Other CYPs	ca. 25	2.5

[†]Data taken from Shimada et al.²¹
[‡]Based on 170 characterized xenobiotics.

Πίνακας 2: Υπεροικογένεια ανθρώπινου κυτοχρώματος P450 (Herrlinger & Klotz, 2001).

Τα φάρμακα πρέπει να διαθέτουν ομάδες που μπορούν να συζευχθούν με γλυκουρονικό ήθειικό οξύ προκειμένου να μετατραπούν σε υδατοδιαλυτούς μεταβολίτες που μπορούν αργότερα να απομακρυνθούν από τα νεφρά. Εάν όχι, πρέπει πρώτα να υποβληθούν σε υδροξυλίωση. Ένα ενζυμικό σύστημα που ενεργοποιεί το μοριακό οξυγόνο είναι διαθέσιμο στο ενδοπλασματικό δίκτυο για το σκοπό αυτό, με στόχο την οξειδωση αυτών των μορίων σε λιπιδικές ενώσεις. Το κυτόχρωμα P450 (CYP), το οποίο υπάρχει στις κυτταρικές ενδοπλασματικές μεμβράνες, έχει αυτή τη συμπεριφορά (Remmer, 1970).

Το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), τα μιτοχόνδρια και τα επιθήλια του λεπτού εντέρου, καθώς και σε μικρότερο βαθμό τα εγγύς σωληνάρια των νεφρών, περιέχουν ένζυμα CYP₄₅₀ που είναι κρίσιμα για την κάθαρση του φαρμάκου (Rustgi, 2016). Ο ρυθμός του μεταβολισμού μιας ουσίας στο ενδοπλασματικό δίκτυο καθορίζει πόσο καλά λειτουργεί ένα φάρμακο και πόσο καιρό χρειάζεται για να τεθεί σε ισχύ. Το ποσοστό των φαρμάκων που μεταβολίζονται από ένζυμα ενδοπλασματικού δικτύου αυξάνεται όταν τα ηπατικά κύτταρα υπερφορτώνονται με πολλαπλές διαλυτές λιπιδικές ενώσεις. Όλες οι λιποδιαλυτές ουσίες αντιδρούν συνεπώς με το κυτόχρωμα P₄₅₀ και οξειδώνονται πιο γρήγορα. Ωστόσο, λόγω της έλλειψης εξειδίκευσης του ενζύμου, τα φάρμακα ανταγωνίζονται για θέσεις δέσμευσης, επιβραδύνοντας τον

μεταβολισμό των φαρμάκων με χαμηλότερη συγγένεια με το ένζυμο (Remmer, 1970). Αυτό το φαινόμενο παρατηρείται λοιπόν στην αλληλεπίδραση δύο φαρμάκων (Tolosa et al., 2016). Τα φάρμακα που μεταβολίζονται από ένζυμα CYP, όπως το CYP3A, είναι γνωστό ότι έχουν μια αρκετά μεγάλη ενεργή θέση και προτιμούν λιπόφιλα υποστρώματα. Οι υδρόφοβες και στερικές αλληλεπιδράσεις του υποστρώματος με τα συγκεκριμένα αμινοξέα στη δραστική θέση του ενζύμου επηρεάζουν συχνά τη δέσμευση και τον προσανατολισμό ενός υποστρώματος και εξαρτώνται κυρίως από τη λιποφιλικότητα (logP) και τις στερικές δομές των υποστρωμάτων. Όταν αυτές οι ομάδες δεν παρεμποδίζονται στερικά, ο βενζυλικός δεσμός C-H, ο αλλυλικός μεθυλεστέρας και οι ομάδες O, N και S-methyl είναι τα προτιμώμενα μεταβολικά μαλακά σημεία, επιτρέποντας στα φάρμακα να υποβληθούν σε μεταβολισμούς P₄₅₀ (Z. Zhang & Tang, 2018).

Εξαιτίας αυτού, το κυτόχρωμα P₄₅₀ (CYP450) περιέχει τα πιο γνωστά ένζυμα μεταβολισμού φαρμάκων, τα οποία είναι κυρίως οξειδάσες, αναγωγάσες και υδρολάσες (Rustgi, 2016). Μια ποικιλία οξειδωτικών και αναγωγικών βιομετασχηματισμών, όπως η υδροξυλίωση του άνθρακα, ο αποκορεσμός υδρογονανθράκων, η οξείδωση ετεροατόμων, η οξείδωση δεσμών και η αποαλογόνωση αλογονοανθράκων, πραγματοποιούνται από αυτήν την κατηγορία ενζύμων. Τα φάρμακα βιομετασχηματίζονται σε μεταβολίτες δεσμεύοντας πρώτα την ενεργό θέση του ενζύμου, η οποία ακολουθείται από καταλυτικό κύκλο εργασιών ή τον λεγόμενο καταλυτικό κύκλο P₄₅₀ (Z. Zhang & Tang, 2018).

Ένας από τους κύριους λόγους για τους οποίους τα φαρμακευτικά προϊόντα αποτυγχάνουν στις κλινικές δοκιμές είναι η ηπατική βλάβη. Η έρευνα και ανάπτυξη της ιατρικής είναι μια δραστηριότητα υψηλού κινδύνου λόγω της σημαντικής οικονομικής δαπάνης που απαιτείται για την κυκλοφορία ενός φαρμάκου στην αγορά και των ταχέων ποσοστών αποικοδόμησης νέων ενώσεων. Επομένως, για την εξοικονόμηση χρόνου και κόστους, η έγκαιρη προκλινική διάγνωση της ηπατοτοξικότητας είναι ζωτικής σημασίας. Συμπερασματικά, είναι ζωτικής σημασίας για την έρευνα φαρμάκων να χρησιμοποιηθούν μοντέλα ηπατικών κυττάρων για την πρόβλεψη της ηπατοτοξικότητας στον ανθρώπινο οργανισμό (Tolosa et al., 2016).

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ HepG2 ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η ηπατοκυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την εργασία είναι η HepG2. Πρόκειται για ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του ήπατος που προέρχονται από Καυκάσιο 15χρονο άνδρα που είχε ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Η κυτταροσειρά HepG2 χρησιμοποιείται συχνά σε μελέτες για ελέγχους της ηπατοτοξικότητας και του μεταβολισμού των φαρμάκων. Τα κύτταρα HepG2 έχουν 55 χρωμοσώματα, μορφολογία που μοιάζει με επιθήλιο, δεν είναι ογκογόνα και πολλαπλασιάζονται σχετικά γρήγορα.

Τα κύτταρα HepG2 προσκολλώνται στον πυθμένα του πιάτου και σχηματίζουν μονοστιβάδες που συσσωρεύονται καθώς αναπτύσσονται. Μπορούν επίσης να εκκρίνουν αρκετές πρωτεΐνες πλάσματος, όπως τρανσφερίνη, ινωδογόνο, πλασμινογόνο και αλβουμίνη. Ένας υψηλός βαθμός μορφολογικής και λειτουργικής διαφοροποίησης στα κύτταρα HepG2 τα καθιστά ιδανικά για τη μελέτη της ενδοκυτταρικής διακίνησης, της σωληνοειδούς χολής, των πρωτεϊνών της ημιτονοειδούς μεμβράνης και της δυναμικής των λιπιδίων στα ανθρώπινα ηπατοκύτταρα. Η μελέτη των ανθρώπινων ηπατικών ασθενειών που προκαλούνται από ακατάλληλη υποκυτταρική κατανομή πρωτεϊνών κυτταρικής επιφάνειας μπορεί να ωφεληθεί από αυτό.

Τα HepG2 κύτταρα καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute), που περιέχει 2 mM L-γλουταμίνη και 1% αντιμικροβιακού διαλύματος (PS-Penicillin (100 μονάδες/ml)/Streptomycin (100μg/ml)), συμπληρωμένο με 10% εμβρυϊκό βόειο ορό (FBS-Fetal Bovine Serum). Η κυτταρικές σειρές HepG2 τοποθετήθηκαν σε ανοιχτή καλλιέργεια - 10 ml θρεπτικού υλικού σε τρυβλίο Petri 100mm, και στη συνέχεια σε κλίβανο με σταθερές συνθήκες (5% CO₂, 37°C). Το θρεπτικό υλικό είναι απαραίτητο να ανανεώνεται κάθε 48h (χρόνος διπλασιασμού της κυτταρικής σειράς), ώστε τα κύτταρα να παραμένουν σε εκθετική φάση πολλαπλασιασμού. Όλα τα παραπάνω συστατικά προμηθεύτηκαν από την Gibco, Invitrogen Corp (ThermoScientific).



Εικόνα 20: Καλλιέργεια κυττάρων HepG2.

2.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

2.2.1 ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΣΕ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΤΡΥΨΙΝΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΜΟΙΡΑΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (SPLIT)

Οι κυτταρικές καλλιέργειες πρέπει να μεταφερθούν σε ένα νέο πιάτο καλλιέργειας (τρυβλίο) με νέο υλικό διατροφής όταν φτάσουν στο 80-90% κάλυψη-πληρότητα του πιάτου καλλιέργειας, διαφορετικά κινδυνεύουν να οδηγηθούν στο κυτταρικό θάνατο. Ο αριθμός ανακαλλιέργειας (passage number) αποτελεί δείκτη για το πόσες φορές η συγκεκριμένη καλλιέργεια έχει ανακαλλιεργηθεί (sub-cultured). Συνιστάται ο αριθμός των κυττάρων που χρησιμοποιούνται στα πειράματα να είναι μεγαλύτερος από 5 για να είναι ακριβή και αξιόπιστα τα αποτελέσματα των πειραματικών διαδικασιών (passage 5).

Προκειμένου να προχωρήσει η περαιτέρω επεξεργασία των κυττάρων, τα κύτταρα μονοστιβάδας πρέπει πρώτα να αποσπαστούν από τον πυθμένα του πιάτου καλλιέργειας. Στη συνέχεια λοιπόν χρησιμοποιείται θρυψίνη για να γίνει αυτό. Η απόσπαση και η αποδιάταξη των κυττάρων είναι οι διαδικασίες που χρησιμοποιούνται για την ανακαλλιέργεια κυττάρων σε ένα νέο πιάτο καλλιέργειας με φρέσκο θρεπτικό μέσο. Η ανακαλλιέργεια τους είναι ευρέως γνωστή ως διαμοιρασμός (split) κυττάρων και είναι απαραίτητη για την διατήρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων. Κάθε τύπος κυττάρου και σειρά κυττάρων έχει έναν μοναδικό χρόνο εκτέλεσης κατανομής που ποικίλλει και είναι αντιστρόφως ανάλογος με τον ρυθμό της κυτταρικής διαίρεσης. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται στην συγκεκριμένη πειραματική εργασία για την αποκόλληση και τον διαμοιρασμό των κυττάρων είναι το παρακάτω:

1. Αρχικά, αφαιρείται το θρεπτικό μέσο από το πιάτο με ένα σιφόνιο ή πιπέτα και για τυχόν υπολείμματα ορού ξεπλένονται οι μονοστιβάδες των κυττάρων με 2ml ρυθμιστικού διαλύματος (PBS, Phosphate buffered Saline) από την Gibco Invitrogen Corp. της ThermoFisher Scientific, το οποίο στην συνέχεια αφαιρείται και αυτό.
2. Μετά από αυτό, προστίθενται 2 ml διαλύματος θρυψίνης-EDTA για την απόσπαση των κυττάρων από τον πυθμένα του πιάτου, έτσι ώστε να μπορούν να υποβληθούν σε περαιτέρω επεξεργασία. Η θρυψίνη πρέπει να καλύπτει ολόκληρη την επιφάνεια της πλάκας καλλιέργειας για να λειτουργήσει, επομένως η ποσότητα που χρησιμοποιείται εξαρτάται από το μέγεθος του πιάτου καθώς επίσης και την κυτταροσειρά. Έπειτα, το πιάτο καλλιέργειας θερμαίνεται στους 37 °C για 5 λεπτά στον επωαστήρα. Οι μεγαλύτεροι χρόνοι επώασης της θρυψίνης μπορούν να βλάψουν μόνιμα τα κύτταρα , καθώς μπορεί να οδηγήσουν στην εξασθένιση της ικανότητας τους να προσκολλούνται στον πυθμένα.
3. Στη συνέχεια απαιτείται η απενεργοποίηση της θρυψίνης η οποία γίνεται με προσθήκη 2ml θρεπτικού υλικού RPMI-1640 ενισχυμένο με ορό FBS + PS. Ακολουθεί η μεταφορά του εναιωρήματος με τα αποκολλημένα πλέον κύτταρα και το θρεπτικό σε ένα falcon 15ml. Το εναιώρημα στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 1250 rpm για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα αποτελεί τα κύτταρα (pellet) που θα χρησιμοποιηθούν.

4. Το κυτταρικό ίζημα που δημιουργείται μετά την φυγοκέντρηση επανεωρείται καλά με αρκετή ποσότητα (πχ. 5ml) θρεπτικού μέσου. Η καλή επαναϊώρηση βοηθά ώστε να γίνει καλή ανάμιξη των κυττάρων με το θρεπτικό μέσο. Έπειτα, χωρίζεται ανάλογα με την επιθυμητή αραιώση σε πιάτα καλλιέργειας με προσθήκη και του θρεπτικού μέσου και με τελικό όγκο συνολικά τα 10ml.
5. Τα κύτταρα τοποθετούνται στον επωαστήρα σε σταθερές συνθήκες 37°C και 5% CO₂. Σε ολόκληρη την παραπάνω εργαστηριακή τεχνική πρέπει να αποφεύγεται η δημιουργία συσσωματωμάτων και φυσαλίδων, καθώς μπορεί να «στρεσάρουν» τα κύτταρα, ενώ επίσης κατά την επιστροφή των κυττάρων στα πιάτα καλλιέργειας συνιστάται η τεχνική της σταγόνας-σταγόνας για ομοιόμορφη κατανομή.



Εικόνα 21: Καλλιέργεια κυττάρων HepG2 έπειτα από αραιώση (split) που επιτρέπει την ανάπτυξη τους.

2.2.2 ΠΑΓΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Προκειμένου να συντηρηθούν τα κύτταρα ζωντανά στην πάροδο του χρόνου αρκεί να κρυοσυντηρηθούν στους -80 °C. Για να έχουμε αρκετή συγκέντρωση κυττάρων που θα αξιοποιηθεί αργότερα για την καλλιέργεια τους χρειάζεται να

υποβληθούν σε αυτή την διαδικασία τουλάχιστον $1 \cdot 10^5$ κύτταρα, διότι η συγκεκριμένη διαδικασία χαρακτηρίζεται από σημαντική απώλεια κυττάρων. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται για το πάγωμα των κυττάρων είναι το παρακάτω:

1. Στα πρώτα βήματα γίνεται η παραπάνω διαδικασία όπως με την αποδιάταξη των κυττάρων, με την χορήγηση θρυψίνης. Έτσι, επαναλαμβάνονται τα βήματα μέχρι το σημείο που προκύπτει το pellet των κυττάρων σε ένα 15 mL falcon.
2. Επακολουθεί η μέτρηση των κυττάρων με την πλάκα Neubauer, ώστε στην συνέχεια να τοποθετηθούν σε vial (cryovial), όπου το κάθε vial να περιέχει ποσότητα κυττάρων περίπου $1 \cdot 10^5$. Το κυτταρικό ίζημα λοιπόν επαναιωρείται με θρεπτικό μέσο που αποτελείται από 90% θρεπτικό με FBS+PS και 10% DMSO. Το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) χρησιμοποιείται ως κρυοπροστατευτικό των κυττάρων.
3. Στη συνέχεια, γίνεται η αποθήκευση 1mL κυττάρων σε κάθε vial προσωρινά στους -80°C στο Thermo Scientific™ Mr.Frosty™ Freezing Container. Για να αποφευχθεί η εμφάνιση θερμικού σοκ στα κύτταρα, η θερμοκρασία μειώνεται σταδιακά σε αυτό το δοχείο κατάψυξης. Τα κύτταρα μπορούν στη συνέχεια να διατηρηθούν μόνιμα σε υγρό άζωτο στους -196°C .

2.2.3 ΑΠΟΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Όταν τα κρυοσυντηρημένα κύτταρα χρειάζεται να χρησιμοποιηθούν για κάποιο πείραμα εφαρμόζεται η διαδικασία απόψυξής τους. Αυτή πρέπει να είναι αρκετά γρήγορη σαν διαδικασία, ώστε να απομακρυνθεί άμεσα το DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο) πριν φτάσει στα κύτταρα. Είναι γνωστό ότι το DMSO σε θερμοκρασία δωματίου για μεγάλο χρονικό διάστημα μπορεί να προκαλέσει τοξικότητα και άρα θάνατο στα κύτταρα. Η διαδικασία απόψυξης είναι η εξής:

1. Το Cryovial μεταφέρεται από τους -196°C στους -80°C και στην συνέχεια σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 λεπτά, ώστε να ξεπαγώσουν τα κύτταρα.

2. Αφού ξεπαγώσουν τα κύτταρα το κυτταρικό εναιώρημα του cryovial (~1ml) μεταφέρεται σε ένα 15mL falcon που περιέχει 4ml θρεπτικού μέσου (RPMI-1640+10%FBS+1%PS). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1250rpm για 5min.
3. Στη συνέχεια, αφαιρείται το υπερκείμενο και επαναιωρείται το κυτταρικό ίζημα με 5mL θρεπτικού μέσου.
4. Μεταφέρεται το θρεπτικό με τα κύτταρα σε ένα πιάτο καλλιέργειας και συμπληρώνεται με θρεπτικό μέσο μέχρι ο όγκος να φτάσει τα 10mL.
5. Τέλος, γίνεται η παρατήρηση των κυττάρων στο μίβροσκοπιο για να επιβεβαιωθεί αν έχουν ομοιόμορφη κατανομή. Έπειτα, το πιάτο καλλιέργειας τοποθετείται στον επωαστήρα στους 37°C και 5%CO₂.

2.2.4 ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΠΛΑΚΑΣ Neubauer

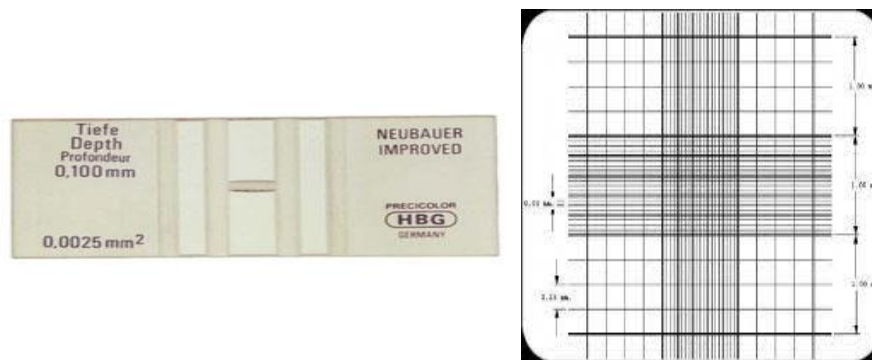
Η καταμέτρηση των κυττάρων είναι μια κρίσιμη διαδικασία που καθορίζει τον ιδανικό αριθμό κυττάρων στην καλλιέργεια. Ανάλογα με το μέγεθος του πιάτου petri, μόνο ένας περιορισμένος αριθμός κυττάρων μπορεί να τοποθετηθεί για καλλιέργεια (Petri 100mm και Petri 60mm). Επίσης, συγκεκριμένη θα πρέπει να είναι και η ποσότητα των κυττάρων που θα τοποθετηθούν σε κάθε πιάτο καλλιέργειας. Στη τρέχουσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν πλάκες καλλιέργειας 96 φρεατίων.

Προκειμένου να μετρηθούν τα κύτταρα με μεγαλύτερη ακρίβεια, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις χρησιμοποιώντας πλάκα Neubauer και μικροσκόπιο μεγέθυνσης 10x. Τα στάδια που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

1. Τα πρώτα στάδια της διαδικασίας είναι ίδια με τα στάδια που ακολουθήθηκαν στην αποδιάταξη των καλλιιεργειών σε μονοκύτταρα με την χρήση τρυψίνης.
2. Το pellet των κυττάρων που προκύπτει μετά την φυγοκέντρηση επαναιωρείται σε 5mL θρεπτικό μέσο (RPMI-1640+10%FBS+1%PS) έτσι ώστε τα κύτταρα να είναι επαρκώς αραιωμένα για την ευκολότερη καταμέτρηση τους.
3. Από το κυτταρικό εναιώρημα 100mL μεταφέρονται σε erpendorf και προσθέτονται σε αυτά 900mL θρεπτικό μέσο (RPMI-

1640+10%FBS+1%PS). Από το περιεχόμενο του erpendorf μεταφέρουμε στην πλάκα καταμέτρησης Neubauer 10μL και στις δύο πλευρές της.

4. Στη συνέχεια, μεταφέρεται η πλάκα στο μικροσκόπιο για μέτρηση των κυττάρων στα 4 αριθμημένα τετράγωνα όπως φαίνονται παρακάτω στην φωτογραφία. Έπειτα, ακολουθεί ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των κυττάρων αθροίζοντας και βρίσκοντας τον μέσο όρο του αριθμού κυττάρων στα 4 τετράγωνα και προσθέτοντας τα με τα υπόλοιπα 4 τετράγωνα της άλλης πλευράς της πλάκας. Έπειτα, διαιρείται το αποτέλεσμα με το 2. Τέλος, πολλαπλασιάζεται το αποτέλεσμα $\cdot 10^4$ και αν έχει γίνει επιπλέον αραιώση σε κάποιο στάδιο, πολλαπλασιάζεται άλλη μια φορά το αποτέλεσμα με το 10, δηλαδή συνολικά με $\cdot 10^5$. Έτσι, υπολογίζεται η συγκέντρωση των κυττάρων σε 1mL.



Εικόνα 22: Πλάκα Neubauer

2.2.5 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΤΑΛΛΗΛΩΝ ΜΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΡΟΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ

Τα μείγματα δημιουργήθηκαν στο πλαίσιο της συνεργασίας μεταξύ του εργαστηρίου Φαρμακολογίας του Τμήματος της Φαρμακευτικής Α.Π.Θ. και της εταιρείας Yanni's Olive Grove. Πρόκειται για τον ελαιοκαρπό άγουρης ελιάς με πολύ υψηλό φαινολικό περιεχόμενο της εταιρείας Yanni's Olive Grove εμπλουτισμένο με διάφορα αντιοξειδωτικά συστατικά με την μορφή φυσικών εκχυλισμάτων και χημικών μορφών βιταμινών. Τα μείγματα δημιουργήθηκε με βάση τις συνιστώμενες

ημερήσιες δόσεις των παραπάνω ουσιών σύμφωνα με τον Ε.Ο.Φ.

Παρόλα αυτά δοκιμάστηκαν 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις (10μg, 5μg και 2μg) των μειγμάτων, ώστε να εξεταστεί πιθανή εμφάνιση κυτταροτοξικότητας με βάση την δοσολογία του δείγματος. Παράλληλα, το δείγμα εξετάστηκε για πιθανή εμφάνιση κυτταροτοξικότητας και στην διάρκεια 120ωρών, ώστε να εξεταστεί αν η εμφάνιση κυτταροτοξικότητας είναι χρονοεξαρτώμενη. Όλα τα παραπάνω πειράματα συγκρίθηκαν μεταξύ των δύο μειγμάτων, δηλαδή αυτού που είχε τα αντιοξειδωτικά σε μορφή καθαρών βιταμινών (χημικές μορφές) και αυτού σε μορφή φυσικών εκχυλισμάτων. Τέλος, στα μείγματα εκτός από τα φυσικά εκχυλίσματα προστέθηκαν και 2 διαφορετικά βελτιωτικά γεύσης (κρέμα μπανάνα –σοκολάτα), οι οποίες και γέμισαν το εσωτερικό των ελαιοκαρπών, και στις οποίες προστέθηκαν και οι αντιοξειδωτικές ουσίες είτε με την μία είτε με την άλλη μορφή (καθαρές βιταμίνες-φυσικά εκχυλίσματα). Τα φυσικά εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

1. Η βιταμίνη Ε ως φυσικό εκχύλισμα Mango.
2. Ελευρωπαΐνη ως φυσικό εκχύλισμα φύλλων ελιάς
3. Ωμέγα-3 λιπαρά οξέα (DHA) ως φυσικό εκχύλισμα θαλασσινης άλγης.

ΟΝΟΜΑ	ΕΛΙΑ ΜΕ ΒΕΛΤΙΩΤΙΚΟ ΓΕΥΣΗΣ	ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΜΟΡΦΗ
ΜΕΙΓΜΑ 1Α	ΣΟΚΟΛΑΤΑ	DHA ΕΛΕΥΡΩΠΑΪΝΗ ΒΙΤΑΜΙΝΗ Ε	ΦΥΣΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ
ΜΕΙΓΜΑ 1Β	ΣΟΚΟΛΑΤΑ	DHA ΕΛΕΥΡΩΠΑΪΝΗ ΒΙΤΑΜΙΝΗ Ε	ΚΑΘΑΡΕΣ ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ
ΜΕΙΓΜΑ 2Α	ΚΡΕΜΑ ΜΠΑΝΑΝΑ	DHA ΕΛΕΥΡΩΠΑΪΝΗ ΒΙΤΑΜΙΝΗ Ε	ΦΥΣΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ
ΜΕΙΓΜΑ 2Β	ΚΡΕΜΑ ΜΠΑΝΑΝΑ	DHA ΕΛΕΥΡΩΠΑΪΝΗ ΒΙΤΑΜΙΝΗ Ε	ΚΑΘΑΡΕΣ ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ

Πίνακας 3: Συστατικά δειγμάτων

2.2.6 ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗΝ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ (CCK-8 ASSAY)

Πολλές τεχνικές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να προσδιοριστεί η βιωσιμότητα των κυττάρων αλλά η διαδικασία CCK-8 είναι η πιο σημαντική και ευέλικτη. Οι δοκιμασίες κυτταρικής βιωσιμότητας και κυτταροτοξικότητας χρησιμοποιούνται συχνά για διαλογή φαρμάκων και για ελέγχους κυτταροτοξικότητας. Το Dojindo Cell Counting Kit-8 χρησιμοποιεί εξαιρετικά υδατοδιαλυτά άλατα τετραζολίου, που ονομάζονται WSTs, για την παραγωγή υδατοδιαλυτών φορμαζανών που είναι κατάλληλα για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την ανάλυση κυτταροτοξικότητας. Τα WST-8 και WST-8 formazan, σε αντίθεση με το MTT, δεν έχουν κυτταροτοξικότητα σε μέσα κυτταροκαλλιέργειας, επιτρέποντας τη διεξαγωγή δοκιμών χρησιμοποιώντας την ίδια πλάκα ανάλυσης. Η χρωματομετρική δοκιμή Dojindo CCK-8 είναι αποτελεσματική για τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας των κυττάρων, καθώς απαιτεί λίγα στάδια, κανένα στάδιο διαλυτοποίησης ή διάλυσης και αποδίδει γρήγορα αποτελέσματα. Το CCK-8 μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε δοκιμές μικροπλακών 96 φρεατίων, καθώς και σε έλεγχο υψηλής απόδοσης σε δοκιμασίες μικροπλακών 384 φρεατίων.

Ανάλογα με το είδος του πειράματος που διεξάγεται και την συγκέντρωση των κυττάρων, μια κατάλληλη πυκνότητα κυττάρων για δοκιμές τοξικότητας είναι μεταξύ 5.000 και 10.000 κυττάρων ανά φρεάτιο. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν $8 \cdot 10^3$ κύτταρα για αυτό το πείραμα, επομένως η μεθοδολογία χρησιμοποιεί μια πλάκα καλλιέργειας 96 φρεατίων με $8 \cdot 10^3$ κύτταρα τοποθετημένα σε κάθε φρεάτιο. 100 μ L κυττάρων σε κάθε φρεάτιο μαζί με 10 μ L ενεργών μέσων εισήχθησαν σε κάθε well. Η διαδικασία CCK-8 μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τους δύο τύπους κυττάρων τόσο για προσκολλημένα κύτταρα όσο και για μη προσκολλημένα κύτταρα. Ωστόσο, όταν χρησιμοποιούνται προσκολλημένα κύτταρα συνιστάται η προ-επώαση τους διότι, κατά τη συλλογή των κυττάρων από μια καλλιέργεια προσκολλημένων κυττάρων, που χρησιμοποιήθηκε θρυψίνη, η δραστηριότητα των κυττάρων δεν είναι φυσιολογική. Εξαιτίας αυτού, είναι απαραίτητο να γίνει προεπώαση των κυττάρων, ώστε να επανέλθουν στη λογαριθμική τους φάση ανάπτυξης. Το πρωτόκολλο λοιπόν που εφαρμόστηκε στην παρούσα ανάλυση είναι το εξής:

1. Κύτταρα καλλιέργειας HepG2 τοποθετήθηκαν σε 96-well πιάτο καλλιέργειας με συγκέντρωση κυττάρων περίπου $8 \cdot 10^3$ κύτταρα σε κάθε well. Προετοιμάστηκαν 2 πιάτα καλλιέργειας 96-well, ένα για τις 24 ώρες και ένα για τις 48 ώρες. Ως τυφλό (control) χρησιμοποιήθηκαν well τα οποία περιείχαν κύτταρα μαζί με θρεπτικό μέσο (RPMI-1640+10%FBS+1%PS) χωρίς την προσθήκη της ουσίας ενώ ως negative control για την εξάλειψη της απορρόφησης του background χρησιμοποιήθηκαν well στα οποία προστέθηκε μόνο θρεπτικό μέσο (RPMI-1640+10%FBS+1%PS). Τα 96-well τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα για 24ώρες (προεπώαση).
2. Στα κύτταρα μετά την πάροδο 24ωρών προστέθηκαν δραστικές με διαφορετικές συγκεντρώσεων (10μg, 5μg και 2μg) τόσο των προϊόντων 1 με φυσικά εκχυλίσματα ως μορφή αντιοξειδωτικών, είτε με βελτιωτικό γεύσης κρέμα-μπανάνα είτε σοκολάτα, όσο και των προϊόντων 2 με καθαρές βιταμίνες ως μορφή αντιοξειδωτικών, είτε με βελτιωτικό γεύσης κρέμα-μπανάνα είτε με σοκολάτα. Κάθε δείγμα με διαφορετική συγκέντρωση περιείχε 3 αντίγραφα (3 τριπλέτες) καθώς επίσης υπήρχαν και 3 αντίγραφα control και 3 αντίγραφα negative control για κάθε συγκέντρωση. Έπειτα, τα 96well πιάτα επώαστηκαν για 24 και 48 ώρες αντίστοιχα σε συνθήκες 37°C και $5\%\text{CO}_2$.
3. Μετά το πέρας του 24ώρου αφαιρείται το υπερκείμενο και πραγματοποιείται πλύση των well με PBS (1X) δύο φορές και έπειτα προσθήκη 100μL θρεπτικού μέσου. Στη συνέχεια προσθέτονται 10 μL CCK-8 διαλύματος kit σε κάθε well. Λόγω φωτοευαισθησίας του αντιδραστηρίου CCK-8 η προσθήκη του στα well γίνεται απουσία φωτός. Έπειτα, ακολουθεί η επώαση του 96-well πιάτου για 4 ώρες στον επωαστήρα.
4. Κάθε μία ώρα λαμβάνονται μετρήσεις για τις υπόλοιπες 4 ώρες. Για την μέτρηση το 96-well πιάτο τοποθετείται σε plate reader (μετρητή φθορισμού) σε μήκος 450nm. Τα αποτελέσματα μας δείχνουν το ποσοστό των κυττάρων που επέζησαν και έπειτα αυτά συγκρίνονται με τα control wells, που περιέχουν μόνο κύτταρα και θρεπτικό χωρίς την παρουσία της ουσίας ελέγχου. Άρα, παρατηρούμε την βιωσιμότητα των κυττάρων με την ουσία σε σύγκριση με τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν φυσιολογικά

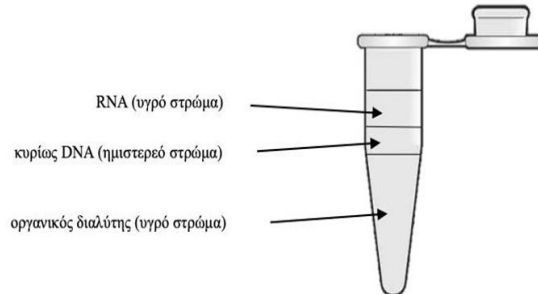
δύο στάδια RT-PCR, και παρέχει τις υψηλές αποδόσεις cDNA για ευαίσθητη ποσοτικοποίηση ακόμη και μεταγραφών χαμηλών συγκεντρώσεων.

Για την διαδικασία της απομόνωσης τα HepG2 κύτταρα επώαστηκαν σε τρυβλίο διαμέτρου 100mm μαζί με τις δραστικές (φυσικά εκχυλίσματα με σοκολάτα, φυσικά εκχυλίσματα με κρέμα-μπανάνα) για χρονικό διάστημα 48 ωρών. Στη συνέχεια, υπολογίστηκε το ποσοστό της κυτταρικής ανάπτυξης, της διαφοροποίησης και των νεκρών κυττάρων. Παράλληλα, υπολογίστηκε και η συγκέντρωση των κυττάρων που πρέπει να πάρουμε από το κάθε καλλιέργεια. Ο όγκος των κυττάρων δεν πρέπει να ξεπερνά το ανώτατο όριο κυττάρων του kit, το οποίο είναι 5×10^6 κύτταρα, ώστε να γίνει απομόνωση επαρκούς ποσότητας mRNA. Τοποθετήθηκε ο κατάλληλος όγκος από κάθε καλλιέργεια σε falcon 15mL και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 900rpm για 10min. Έπειτα, γίνεται απόχυση του υπερκείμενου και τα κύτταρα πλένονται με PBS 1x με την βοήθεια ήπιου vortex. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες 2 φορές. Η πλύση των κυττάρων είναι απαραίτητη ώστε να καθαριστούν από υπολείμματα του θρεπτικού μέσου.

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν στην συνέχεια ήταν σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Kit για την απομόνωση του ολικού κυτταροπλασματικού RNA και είναι τα εξής:

1. Αναρρόφηση υπερκείμενου και προσθήκη 1ml RNeasy Plus (Qiagen), το οποίο είναι λύει τα κύτταρα
2. Αφήνεται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
3. Αναμιγνύεται με 0,2 mL χλωροφορμίου
4. Αφήνεται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
5. Φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στους 4°C και 12000g
6. Διαχωρισμός συστατικών σε 3 στρώματα. Συλλογή του πάνω στρώματος (ολικό RNA) σε νέο φυαλίδιο συγκέντρωσης
7. Αναμιγνύεται με ίση ποσότητα ισοπροπανόλης
8. Αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά
9. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στους 4°C και 12000g
10. Αφαίρεση υπερκείμενου καθώς το RNA καθιζάνει σαν ίζημα
11. Επαναδιαλυτοποιείται σε 1mL αιθανόλης 75%
12. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στους 4°C και 7500g ώστε να καθαριστεί
13. Απορρόφηση υπερκείμενου και ξήρανση του ιζήματος

14. Επαναδιαλυτοποίηση σε όγκο dH₂O ανάλογο της ποσότητας RNA
15. Το dH₂O RNA φυλάσσεται στους -80°C



Εικόνα 24: Φάσεις DNA και RNA (εικόνα από QuantiTech Reverse Transcription handbook)

2.3.2 ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ RNA

Χρησιμοποιώντας το Nanodrop 2000 / Thermo Scientific, μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση των δειγμάτων στα 260 nm και 280 nm προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση και η απορρόφηση του δείγματος. Οι αναλογίες A260/A280 και A260 / A230 χρησιμεύουν ως δείκτες καθαρότητας RNA. Η αναλογία A260/A280, η οποία κυμαίνεται από 2,0 έως 2,2, πρέπει να είναι μεγαλύτερη από την αναλογία A260 / A230. Μια απόκλιση από αυτές τις τιμές υποδηλώνει ότι το δείγμα περιέχει πρωτεΐνες, φαινόλη ή άλλα στοιχεία.

2.4 REAL TIME QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-qPCR)

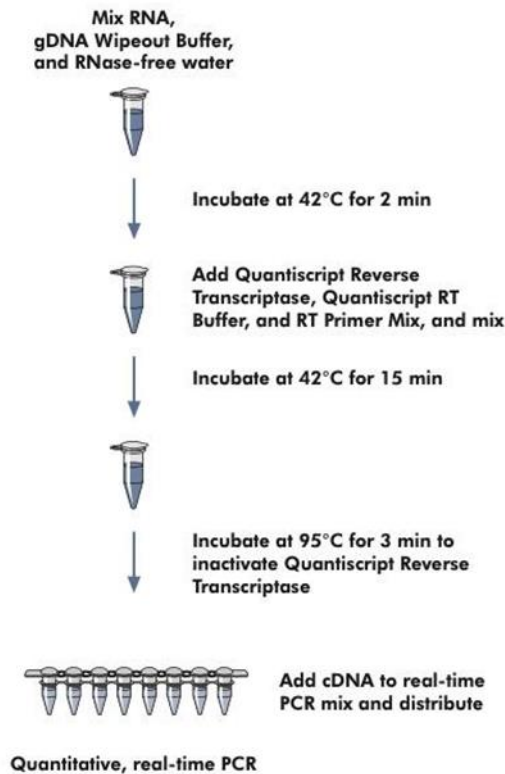
2.4.1 ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΓΕΝΟΣΩΜΙΚΟΥ DNA (Genomic DNA- gDNA)

Το DNA του μολυσματικού γονιδίου αποβάλλεται από τα καθαρισμένα δείγματα επωάζοντάς τα σε διάλυμα Wireout gDNA στους 42°C για δύο λεπτά. Χωρίς πρόσθετη αφαίρεση του γονιδιωματικού DNA, τα δείγματα στη συνέχεια χρησιμοποιούνται αμέσως στη διαδικασία αντίστροφης μεταγραφής. Η επιλογή των εκκινητών που προορίζονται να αποτρέψουν ή να μειώσουν την ανίχνευση γονιδιωματικού DNA θα επηρεάσουν τα αποτελέσματα της RT-PCR σε πραγματικό χρόνο. Εάν δεν υπάρχουν τέτοιοι εκκινητές ή ανιχνευτές, τότε η μόλυνση γονιδιωματικού DNA σε δείγματα RNA πρέπει να εξαλειφθεί.

2.4.2 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΤΟΥ RNA

Το RT² first Strand Kit της εταιρείας Qiagen, ένα μείγμα που περιλαμβάνει αντίστροφη μεταγραφάση, ρυθμιστικό διάλυμα Quantiscrypt RT και μίγμα εκκινητή RT, χρησιμοποιείται για την προετοιμασία του δείγματος RNA για αντίστροφη μεταγραφή μετά την αφαίρεση του γονιδιωματικού DNA. Στους 42°C, εμφανίζεται η πλήρης αντίδραση και στους 95°C, απενεργοποιείται. Σε αντίθεση με τις προηγούμενες τεχνικές, αυτή δεν απαιτεί επιπλέον βήματα για μετουσίωση RNA, μετριασμό εκκινητή ή πέψη RNase H. Η αντίστροφη μεταγραφάση RT² έχει σχεδιαστεί για ευαίσθητη και αποτελεσματική σύνθεση cDNA από 10 pg έως 1 g RNA και έχει υψηλή συγγένεια για RNA. Ακόμη και από πρότυπα με υψηλή περιεκτικότητα σε GC ή περίπλοκη δευτερογενή δομή, είναι δυνατές εξαιρετικές αποδόσεις cDNA λόγω της ισχυρής συγγένειας για το RNA και το ρυθμιστικό διάλυμα RT². Ακόμη και από τις 5' περιοχές μεταγραφών RNA, το RT Primer Mix εξασφαλίζει σύνθεση cDNA. Εξαιτίας αυτού, είναι δυνατές σημαντικές ποσότητες προτύπων cDNA για ανάλυση PCR σε πραγματικό χρόνο ανεξάρτητα από το πού βρίσκεται η θέση στόχου στο αντίγραφο.

QuantiTect Reverse Transcription Procedure



Εικόνα 25: Βήματα παραγωγής αντίστροφης μεταγραφής (εικόνα από QuantiTech Reverse Transcription handbook)

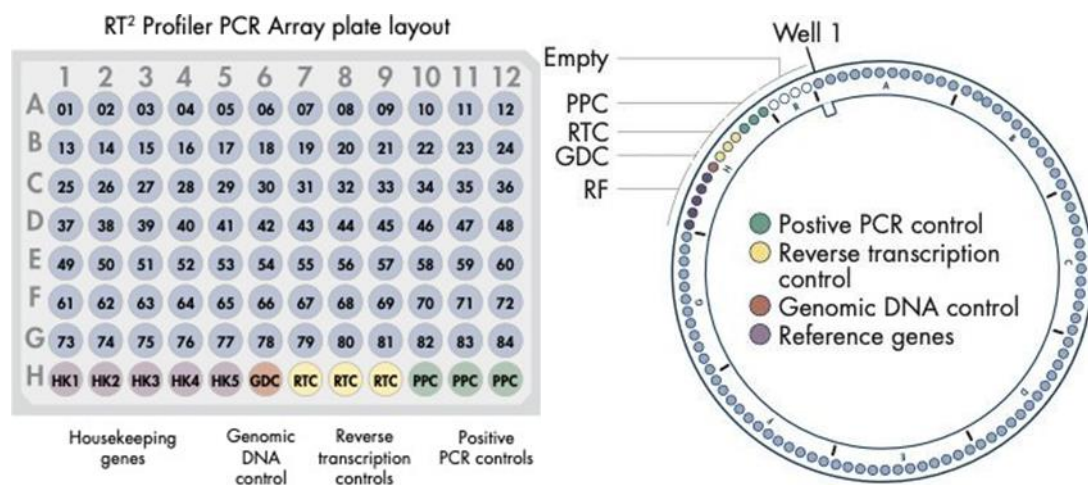
2.4.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (REAL TIME QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION, RT- qPCR)

Η real time-qPCR είναι μια μέθοδος που συλλέγει ταυτόχρονα δεδομένα σε όλη τη διαδικασία της, ενσωματώνοντας την ενίσχυση και την ανίχνευση σε ένα βήμα. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση μιας σειράς φθορίζουσών ενώσεων που συνδέουν τη συγκέντρωση του προϊόντος PCR με την ένταση φθορισμού. Η περίοδος (ή ο κύκλος PCR) στην οποία παρατηρείται για πρώτη φορά η ενίσχυση στόχου βοηθά στην κατηγοριοποίηση των αντιδράσεων. Το κατώφλι ανίχνευσης κύκλου (Ct), ή το σημείο στο οποίο η ένταση φθορισμού υπερβαίνει τον φθορισμό υποβάθρου,

είναι το όνομα που δίνεται σε αυτήν την παράμετρο. Ως αποτέλεσμα, μια σημαντική αύξηση του φθορίζοντος σήματος θα συμβεί πιο γρήγορα όσο περισσότερο DNA στόχος υπάρχει στο αρχικό υλικό, οδηγώντας σε χαμηλότερο Ct.

Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιεί συχνά μια πρόσθετη φθορίζουσα ουσία για να επιτύχει τα επιθυμητά αποτελέσματα. Το SYBR green είναι μια ασύμμετρη χρωστική ουσία που δεσμεύεται με τα δίκλινα μόρια DNA, που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου της διαδικασίας PCR, προκειμένου να προσδιοριστούν τα τελικά αποτελέσματα της PCR. Στη συνέχεια, η χρωστική ουσία υφίσταται δομικές αλλαγές και χάνει μέρος της κινητικότητάς της, προκαλώντας την παραγωγή φθορισμού με την απελευθέρωση ενέργειας. Η ένωση της βαφής και του DNA απορροφά το μπλε φως με μέγιστο μήκος κύματος 497 nm και εκπέμπει πράσινο φως με μέγιστο μήκος κύματος 520 nm.

84 σημαντικά γονίδια που θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως πιθανοί δείκτες ηπατικής τοξικότητας καταγράφονται στη συστοιχία RT² Profiler PCR Array human hepatotoxicity. Οι σημαντικότεροι πιθανοί δείκτες για τις πέντε κύριες ηπατοτοξικές ασθένειες περιλαμβάνονται όλοι σε αυτόν τον πίνακα. Η πλάκα επίσης περιλαμβάνει 5 housekeeping genes, 1 genomic DNA control, 3 control αντίστροφης μεταγραφής και 3 θετικά PCR controls.



Εικόνα 26: Διαβάθμιση array 2 (96 γονίδια – 1 δείγμα ανά πλάκα) (εικόνες από QuantiTech Reverse Transcription handbook).

Position	UniGene	GenBank	Symbol	Description
A01	Hs.489033	NM_000927	ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1
A02	Hs.658439	NM_003742	ABCB11	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 11
A03	Hs.654403	NM_000443	ABCB4	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4
A04	Hs.368243	NM_000392	ABCC2	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2
A05	Hs.463421	NM_003786	ABCC3	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3
A06	Hs.513490	NM_000034	ALDOA	Aldolase A, fructose-bisphosphate
A07	Hs.73722	NM_080649	APEX1	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1
A08	Hs.527412	NM_004315	ASAH1	N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase) 1
A09	Hs.216623	NM_005603	ATP8B1	ATPase, aminophospholipid transporter, class I, type 8B, member 1
A10	Hs.2131	NM_000706	AVPR1A	Arginine vasopressin receptor 1A
A11	Hs.80756	NM_001713	BHMT	Betaine--homocysteine S-methyltransferase
A12	Hs.519162	NM_006763	BTG2	BTG family, member 2
B01	Hs.82129	NM_005181	CA3	Carbonic anhydrase III, muscle specific
B02	Hs.141125	NM_004346	CASP3	Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase
B03	Hs.79101	NM_004060	CCNG1	Cyclin G1
B04	Hs.120949	NM_000072	CD36	CD36 molecule (thrombospondin receptor)
B05	Hs.647419	NM_001251	CD68	CD68 molecule
B06	Hs.40582	NM_003671	CDC14B	CDC14 cell division cycle 14 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)
B07	Hs.370771	NM_000389	CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)
B08	Hs.17441	NM_001845	COL4A1	Collagen, type IV, alpha 1
B09	Hs.370703	NM_015974	CRYL1	Crystallin, lambda 1
B10	Hs.522891	NM_000609	CXCL12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12
B11	Hs.1361	NM_000761	CYP1A2	Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2
B12	Hs.480378	NM_145244	DDIT4L	DNA-damage-inducible transcript 4-like
C01	Hs.311609	NM_005804	DDX39A	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 39A
C02	Hs.317192	NM_016306	DNAJB11	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 11
C03	Hs.59214	NM_006260	DNAJC3	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3
C04	Hs.380135	NM_001443	FABP1	Fatty acid binding protein 1, liver
C05	Hs.503546	NM_013402	FADS1	Fatty acid desaturase 1
C06	Hs.271614	NM_016049	FAM158A	Family with sequence similarity 158, member A
C07	Hs.83190	NM_004104	FASN	Fatty acid synthase
C08	Hs.1424	NM_002021	FMO1	Flavin containing monooxygenase 1
C09	Hs.54943	NM_012192	FXC1	Fracture callus 1 homolog (rat)
C10	Hs.80409	NM_001924	GADD45A	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
C11	Hs.654465	NM_001498	GCLC	Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit
C12	Hs.271510	NM_000637	GSR	Glutathione reductase
D01	Hs.659767	NM_016527	HAO2	Hydroxyacid oxidase 2 (long chain)
D02	Hs.517581	NM_002133	HMOX1	Heme oxygenase (decycling) 1
D03	Hs.182385	NM_002151	HPN	Hepsin
D04	Hs.277704	NM_006389	HYOU1	Hypoxia up-regulated 1
D05	Hs.643447	NM_000201	ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1
D06	Hs.839	NM_004970	IGFALS	Insulin-like growth factor binding protein, acid labile subunit
D07	Hs.532082	NM_002184	IL6ST	Interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)
D08	Hs.411865	NM_024658	IPO4	Importin 4
D09	Hs.152385	NM_019600	KIAA1370	KIAA1370

Position	UniGene	GenBank	Symbol	Description
D10	Hs.406013	NM_000224	KRT18	Keratin 18
D11	Hs.533782	NM_002273	KRT8	Keratin 8
D12	Hs.256034	NM_024884	L2HGDH	L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase
E01	Hs.658889	NM_003667	LGR5	Leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5
E02	Hs.180878	NM_000237	LPL	Lipoprotein lipase
E03	Hs.596543	NM_002340	LSS	Lanosterol synthase (2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase)
E04	Hs.654473	NM_000898	MAOB	Monoamine oxidase B
E05	Hs.194694	NM_004672	MAP3K6	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6
E06	Hs.499674	NM_000242	MBL2	Mannose-binding lectin (protein C) 2, soluble
E07	Hs.198363	NM_182751	MCM10	Minichromosome maintenance complex component 10
E08	Hs.647055	NM_032951	MLXIP1	MLX interacting protein-like
E09	Hs.655329	NM_014046	MRPS18B	Mitochondrial ribosomal protein S18B
E10	Hs.406515	NM_000903	NQO1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1
E11	Hs.289008	NM_138459	NUS1	Nuclear undecaprenyl pyrophosphate synthase 1 homolog (S. cerevisiae)
E12	Hs.120658	NM_003999	OSMR	Oncostatin M receptor
F01	Hs.630585	NM_152672	OSTalpha	Organic solute transporter alpha
F02	Hs.22584	NM_024411	PDYN	Prodynorphin
F03	Hs.389452	NM_030821	PLA2G12A	Phospholipase A2, group XIIA
F04	Hs.103110	NM_005036	PPARA	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha
F05	Hs.152978	NM_176863	PSME3	Proteasome (prosome, macropain) activator subunit 3 (PA28 gamma; Ki)
F06	Hs.282417	NM_002863	PYGL	Phosphorylase, glycogen, liver
F07	Hs.408528	NM_000321	RB1	Retinoblastoma 1
F08	Hs.263671	NM_002906	RDX	Radixin
F09	Hs.131835	NM_020407	RHBG	Rh family, B glycoprotein (gene/pseudogene)
F10	Hs.416073	NM_002964	S100A8	S100 calcium binding protein A8
F11	Hs.558396	NM_005063	SCD	Stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)
F12	Hs.534293	NM_001085	SERPINA3	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin, antitrypsin), member 3
G01	Hs.414795	NM_000602	SERPINE1	Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1
G02	Hs.581632	NM_005414	SKIL	SKI-like oncogene
G03	Hs.327179	NM_006632	SLC17A3	Solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 3
G04	Hs.419240	NM_006931	SLC2A3	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3
G05	Hs.729034	NM_012319	SLC39A6	Solute carrier family 39 (zinc transporter), member 6
G06	Hs.592123	NM_004176	SREBF1	Sterol regulatory element binding transcription factor 1
G07	Hs.503998	NM_003186	TAGLN	Transgelin
G08	Hs.591969	NM_003251	THRSP	Thyroid hormone responsive
G09	Hs.494146	NM_013390	TMEM2	Transmembrane protein 2
G10	Hs.728817	NM_003330	TXNRD1	Thioredoxin reductase 1
G11	Hs.463964	NM_017983	WIPI1	WD repeat domain, phosphoinositide interacting 1
G12	Hs.301564	NM_024640	YRDC	YrdC domain containing (E. coli)
H01	Hs.520640	NM_001101	ACTB	Actin, beta
H02	Hs.534255	NM_004048	B2M	Beta-2-microglobulin
H03	Hs.592355	NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H04	Hs.412707	NM_000194	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
H05	Hs.546285	NM_001002	RPLP0	Ribosomal protein, large, P0
H06	N/A	SA_00105	HGDC	Human Genomic DNA Contamination
H07	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H08	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H09	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H10	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H11	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H12	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control

Πίνακας 4: Εμπειροχόμενα γονίδια(πίνακας από QuantiTech Reverse Transcription handbook).

Το RT² SYBR Green qPCRMastermix της εταιρείας Qiagen, μαζί με τον συνδυασμό του δείγματος cDNA που κατασκευάστηκε παραπάνω, με RNAase free water και το βελτιστοποιημένο kit για την Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου PCR σε πραγματικό χρόνο, χρησιμοποιήθηκε για μια διαδικασία σύνθεσης τελικού όγκου 25μL. Το kit για την Αλυσιδωτής Αντίδρασης

Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου περιλαμβάνει Ταq πολυμεράση, ρυθμιστικό διάλυμα real-time PCR, primers, SYBR[®] Green I χρωστική και νουκλεοτίδια. Η πλάκα 96 φρεατίων τοποθετείται στη συσκευή QuantStudio 5 της εταιρείας Labnet για την εκτέλεση της αντίδρασης με τα ακόλουθα στάδια λογισμικού:

1. Θερμοκρασία προθέρμανσης στους 95°C για 10'.
2. Θερμοκρασία ξεδιπλώματος των δύο κλώνων στους 95°C για 15'.
3. Θερμοκρασία σύνδεσης εναρκτήριων τμημάτων σε κάθε αλυσίδα των δύο κλώνων στους 60°C για 1'.
4. Θερμοκρασία επιμήκυνσης στους 95°C για 15'.
5. Καμπύλη τήξεως στους 60-95°C.
6. Λήξη αντίδρασης και ψήξη 30°C 00:10.

Τα βήματα 2-5 γίνονται κατά την διάρκεια 40 κύκλων.

Ο υπολογισμός της διαφοράς γονιδιακής έκφρασης μεταξύ κάθε δείγματος και του δείγματος βαθμονομητή επιτρέπει την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων (control-τυφλό δείγμα). Πριν τον τελικό υπολογισμό πρέπει να γίνει η ομαλοποίηση των ευρημάτων έκφρασης γονιδίου στόχου με τα αποτελέσματα έκφρασης γονιδίου αναφοράς, (housekeeping gene).Επισημαίνονται λοιπόν οι ακόλουθοι υπολογισμοί:

$$\Delta Ct (\text{target-house keeping}) = Ct(\text{target}) - Ct(\text{housekeeping gene})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{target-housekeeping gene}) - \Delta Ct(\text{control-housekeeping})$$

$$\text{Expression: } 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Όλες οι τιμές Ct και για τα δείγματα του treatment (φυσικά εκχυλίσματα σοκολάτα και κρέμα μπανάνα) και για το control-τυφλό κανονικοποιούνται σε σχέση με το γονίδιο αναφοράς για την εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

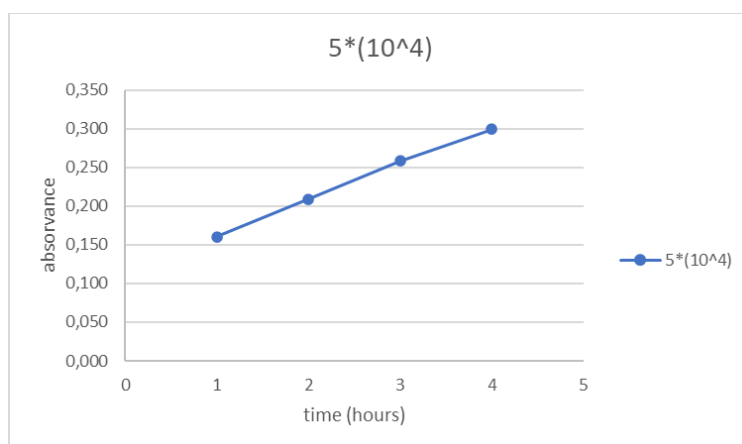
3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ – ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ (CCK-8 ASSAY)

3.1.1 ΠΡΟΤΥΠΗ ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ HepG2

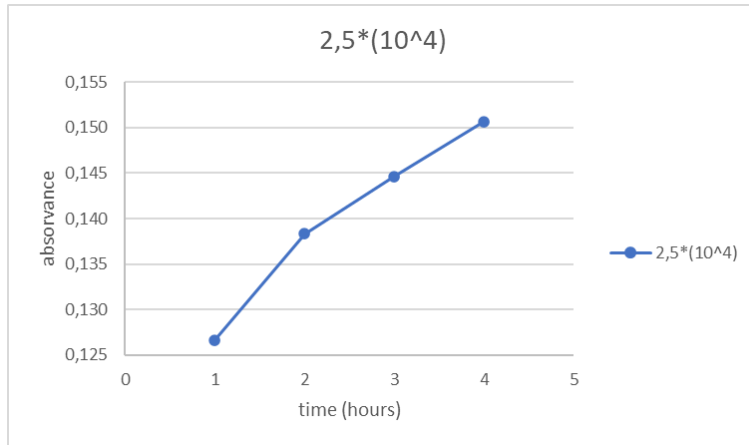
Με βάση τα παρακάτω αποτελέσματα στην κυτταροσειρά (HepG2) για συγκεντρώσεις κυττάρων $5 \cdot 10^4$, $2,5 \cdot 10^4$, $1,25 \cdot 10^4$ και $6,25 \cdot 10^3$ έγινε το πείραμα που αφορά την πρότυπη καμπύλη αναφοράς της κυτταροσειράς. Από τα αποτελέσματα του πειράματος καθώς επίσης και με εκτενή αναζήτηση στη βιβλιογραφία επιλέχθηκε η συγκέντρωση των $8 \cdot 10^3$ κύτταρα/well για την πραγματοποίηση των παρακάτω πειραμάτων.

cell concentration	CCK-8 (1hr)	CCK-8 (2hr)	CCK-8 (3hr)	CCK-8 (4hr)
$5 \cdot 10^4$	0,160	0,209	0,258	0,299
$2,5 \cdot 10^4$	0,127	0,138	0,145	0,151
$1,25 \cdot 10^4$	0,062	0,066	0,072	0,078
$6,25 \cdot 10^3$	0,030	0,032	0,035	0,038

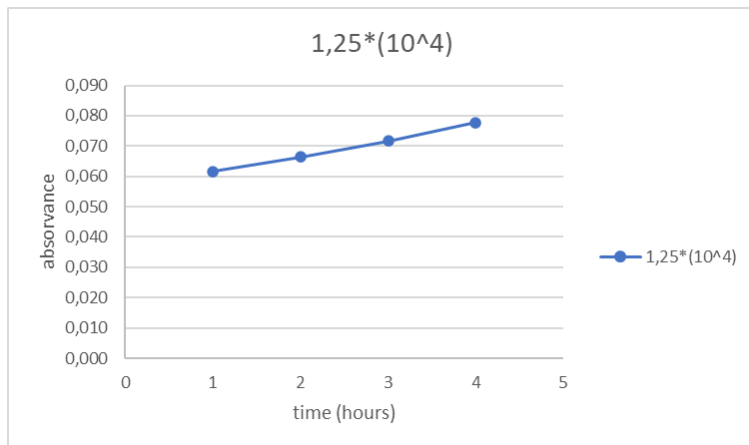
Πίνακας 5: Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης αναφοράς



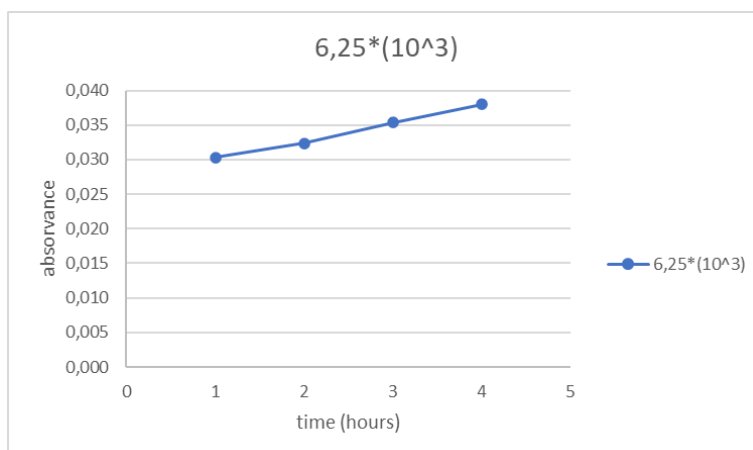
Σχήμα 1: Πρότυπη καμπύλη αρχικής συγκέντρωσης των κυττάρων HepG2, $5 \cdot 10^4$



Σχήμα 2: Πρότυπη καμπύλη αρχικής συγκέντρωσης των κυττάρων HepG2, $2,5 \cdot 10^4$



Σχήμα 3: Πρότυπη καμπύλη αρχικής συγκέντρωσης των κυττάρων HepG2, $1,25 \cdot 10^4$



Σχήμα 4: Πρότυπη καμπύλη αρχικής συγκέντρωσης των κυττάρων HepG2, $6,25 \cdot 10^3$

3.1.2 ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ (CCK-8 ASSAY) – ΔΟΣΟΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Η κυτταρική σειρά HepG2 υποβλήθηκε σε ένα δοσοεξαρτώμενο πείραμα με τα 2 προϊόντα (ελαιοκαρπός με βελτιωτικό γεύσης σοκολάτα και ελαιοκαρπός με βελτιωτικό γεύσης κρέμα-μπανάνα) είτε με αντιοξειδωτικά σε μορφή φυτικών εκχυλισμάτων είτε με αντιοξειδωτικά σε μορφή καθαρών βιταμινών, για διάρκεια 24 και 48 ωρών και σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρουσιάζουν το ποσοστό των κυττάρων επιβίωσης καθώς επίσης και τον προσδιορισμό της βέλτιστης συγκέντρωσης αντιοξειδωτικών στα δείγματα. Κάθε συγκέντρωση είχε 3 αντίγραφα σε κάθε πειραματική πορεία τόσο για τις 24 όσο και για τις 48 ώρες. Η βιωσιμότητα των κυττάρων υπολογίστηκε από την σύγκριση των αποτελεσμάτων των δειγμάτων με την συγκέντρωση του control δείγματος που αποτελείται μόνο από θρεπτικό μέσο (RPMI-1640+10%FBS+1%PS) μαζί με την σταθερή συγκέντρωση των κυττάρων (8000 κύτταρα /well).

Από τα παρακάτω διαγράμματα φαίνεται μια σταθερή μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων (survival rate %) με την πάροδο του χρόνου και καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση των δραστικών και στα 2 μείγματα και με τις 2 μορφές αντιοξειδωτικών. Η μείωση αυτή κυμαίνεται σε αποδεκτά όρια γεγονός που αποδεικνύει ότι τα συγκεκριμένα προϊόντα, με τις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις δεν προκαλούν σημαντική κυτταροτοξικότητα στην συγκεκριμένη κυτταρική σειρά. Επίσης, από τα παρακάτω γίνεται εμφανές ότι και στα 2 δείγματα η χρήση των φυτικών εκχυλισμάτων ως αντιοξειδωτικά σε σύγκριση με τις καθарές βιταμίνες απέδωσαν καλύτερα αποτελέσματα με σχετικά μικρές όμως διαφορές. Επιπλέον, όσον αφορά τις μετρήσεις στις 4 διαφορετικές ώρες η βιωσιμότητα των κυττάρων παραμένει σταθερή με ποσοστό που κυμαίνεται περίπου από 80-40%. Συμπερασματικά, με βάση τα παρακάτω διαγράμματα και πίνακες αποφασίσαμε να κρατήσουμε την μεγαλύτερη συγκέντρωση, δηλαδή τα 10μg δραστικής, καθώς τα αποτελέσματα που προέκυψαν δεν είχαν μεγάλες αποκλείσεις και όλα ήταν μέσα σε αποδεκτά όρια. Αυτή η συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκε στο χρονοεξαρτώμενο πείραμα που έγινε στην συνέχεια.

24 HRS SURVIVAL RATE (%)					
	API concentration	CCK-8 (1 hr)	CCK-8 (2 hrs)	CCK-8 (3 hrs)	CCK-8 (4 hrs)
PURE VITAMINS	10 µg	70,8	59,9	45,2	33,0
	5 µg	75,3	63,4	51,8	39,9
	2 µg	80,4	69,3	56,2	44,1
NATURAL EXTRACTS	10 µg	90,4	78,8	65,5	56,4
	5 µg	93,2	83,2	70,1	61,5
	2 µg	95,4	88,2	77,9	68,4

Πίνακας 6: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση 24 ωρών με το μείγμα
1

24 HRS SURVIVAL RATE (%)					
	API concentration	CCK-8 (1 hr)	CCK-8 (2 hrs)	CCK-8 (3 hrs)	CCK-8 (4 hrs)
PURE VITAMINS	10 µg	71,7	60,5	46,6	32,2
	5 µg	76,7	65,2	51,0	39,6
	2 µg	80,8	69,3	59,8	48,1
NATURAL EXTRACTS	10 µg	89,0	74,0	65,3	55,3
	5 µg	91,3	79,6	69,5	59,1
	2 µg	96,3	82,9	75,5	66,4

Πίνακας 7: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση 24 ωρών με το μείγμα
2

24 HRS SURVIVAL RATE (%)					
	API concentration	CCK-8 (1 hr)	CCK-8 (2 hrs)	CCK-8 (3 hrs)	CCK-8 (4 hrs)
CONTROL	0 µg	100,0	100,0	100,0	100,0

Πίνακας 8: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση 24 ωρών – control
δείγμα

48 HRS SURVIVAL RATE (%)					
	API concentration	CCK-8 (1 hr)	CCK-8 (2 hrs)	CCK-8 (3 hrs)	CCK-8 (4 hrs)
PURE VITAMINS	10 µg	67,8	51,9	40,2	30,2
	5 µg	71,0	58,9	45,9	34,3
	2 µg	75,7	61,3	50,3	39,1
NATURAL EXTRACTS	10 µg	80,0	70,7	58,3	50,5
	5 µg	84,3	77,0	64,5	57,5
	2 µg	90,2	80,5	68,0	60,0

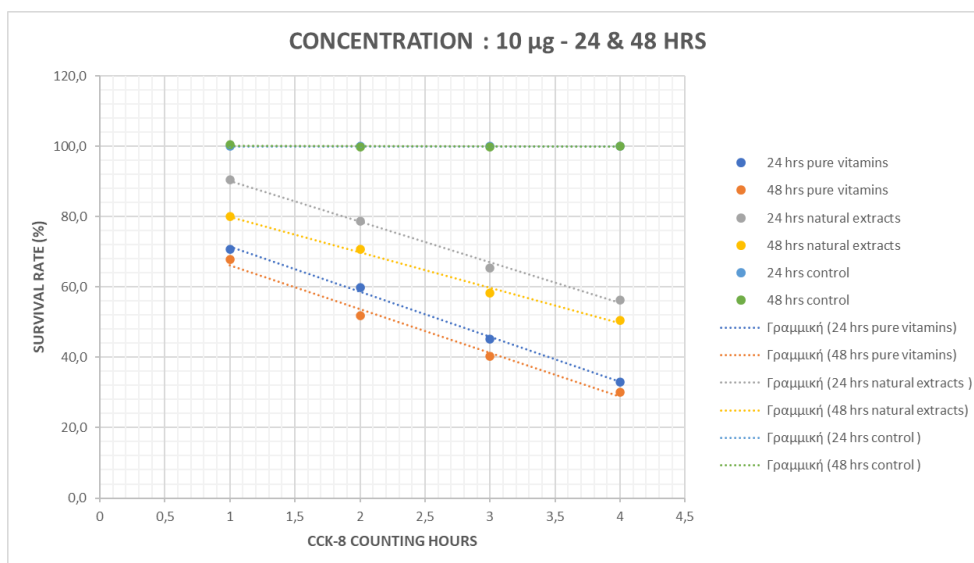
Πίνακας 9: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση 48 ωρών με το μείγμα
1

48 HRS SURVIVAL RATE (%)					
	API concentration	CCK-8 (1 hr)	CCK-8 (2 hrs)	CCK-8 (3 hrs)	CCK-8 (4 hrs)
PURE VITAMINS	10 µg	66,3	52,8	41,8	30,0
	5 µg	71,8	61,7	46,3	34,9
	2 µg	76,1	63,8	52,6	41,7
NATURAL EXTRACTS	10 µg	82,4	71,1	56,3	49,9
	5 µg	85,5	77,0	60,7	55,7
	2 µg	91,0	78,2	65,9	58,6

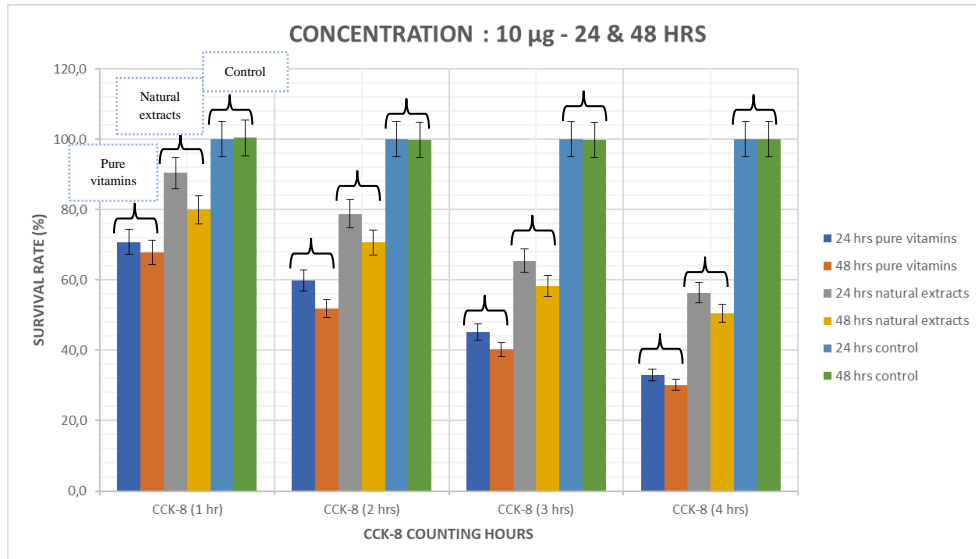
Πίνακας 10: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση 48 ωρών με το μείγμα 2

48 HRS SURVIVAL RATE (%)					
	API concentration	CCK-8 (1 hr)	CCK-8 (2 hrs)	CCK-8 (3 hrs)	CCK-8 (4 hrs)
CONTROL	0 µg	100,4	99,8	99,9	100,0

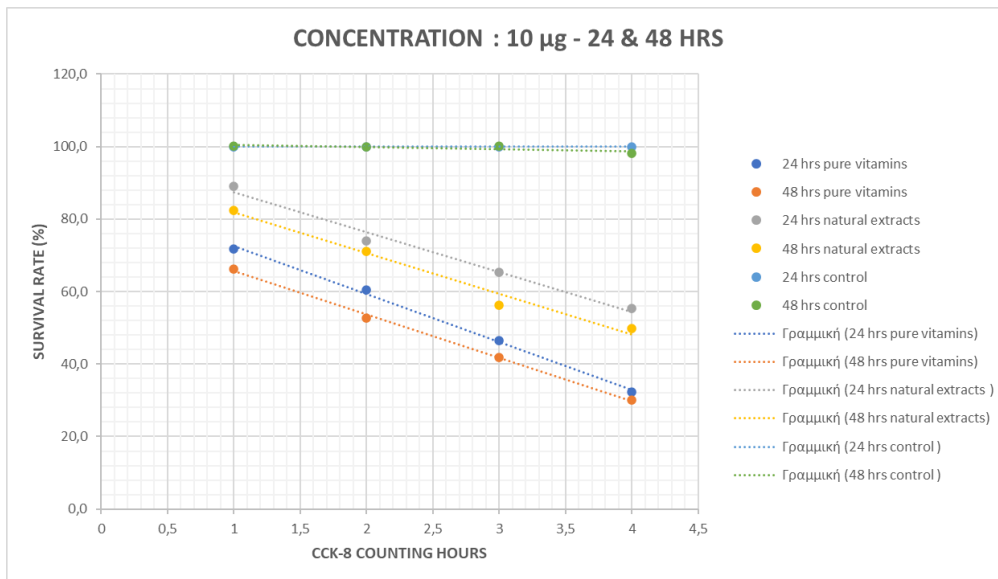
Πίνακας 11: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση 24 ωρών – control δείγμα



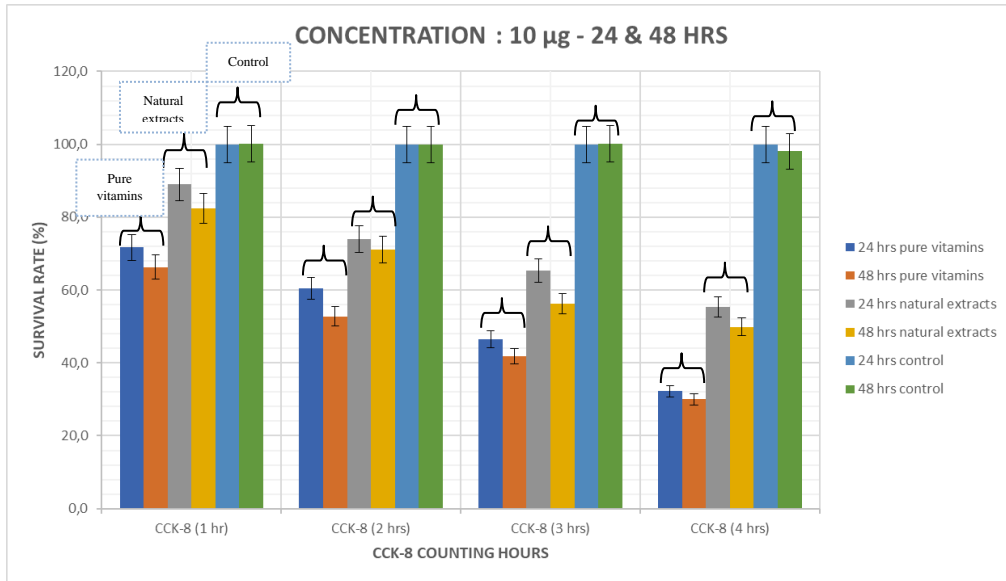
Σχήμα 5: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 24-48 ωρών με το μείγμα 1 (10µg) 1



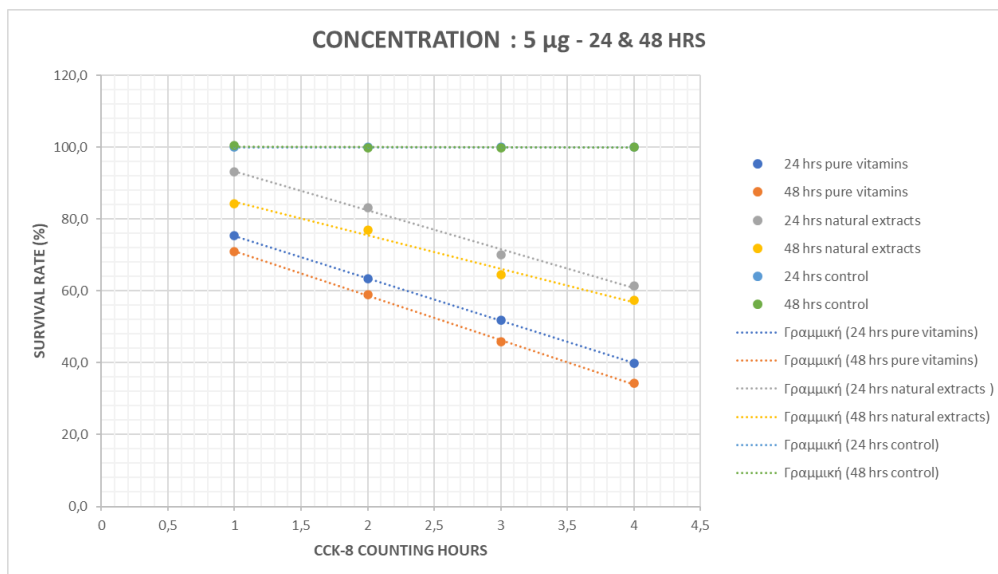
Σχήμα 6: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 24-48 ώρες με το μείγμα 1 (10 μ g) 2



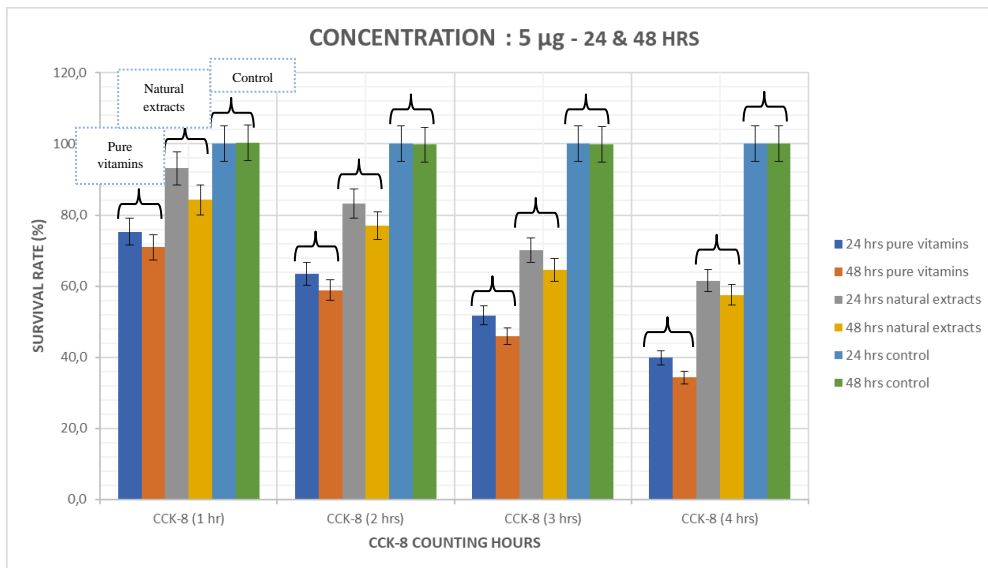
Σχήμα 7: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 24-48 ωρών με το μείγμα 2 (10 μ g) 1



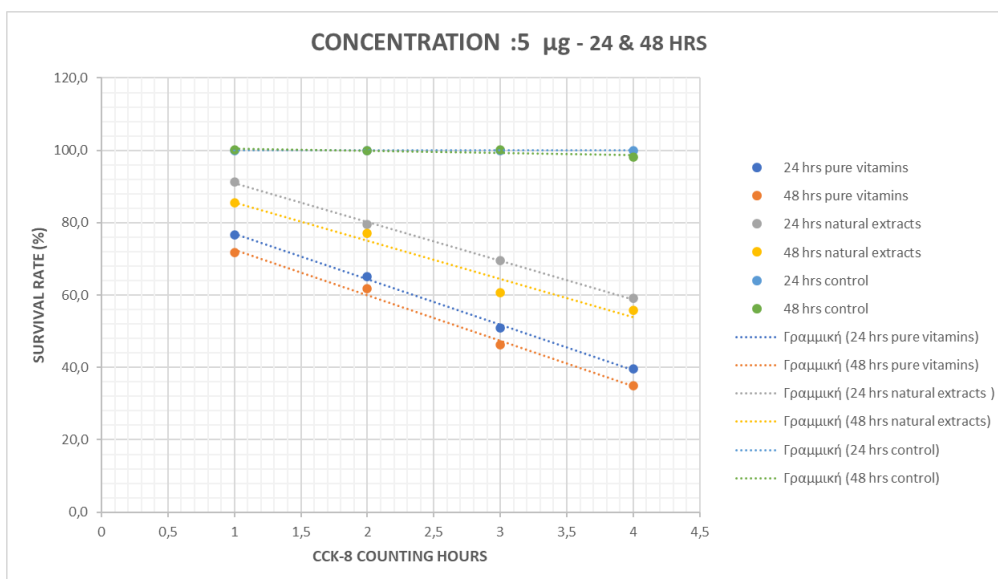
Σχήμα 8: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 24-48 ωρών με το μείγμα 2 (10µg) 2



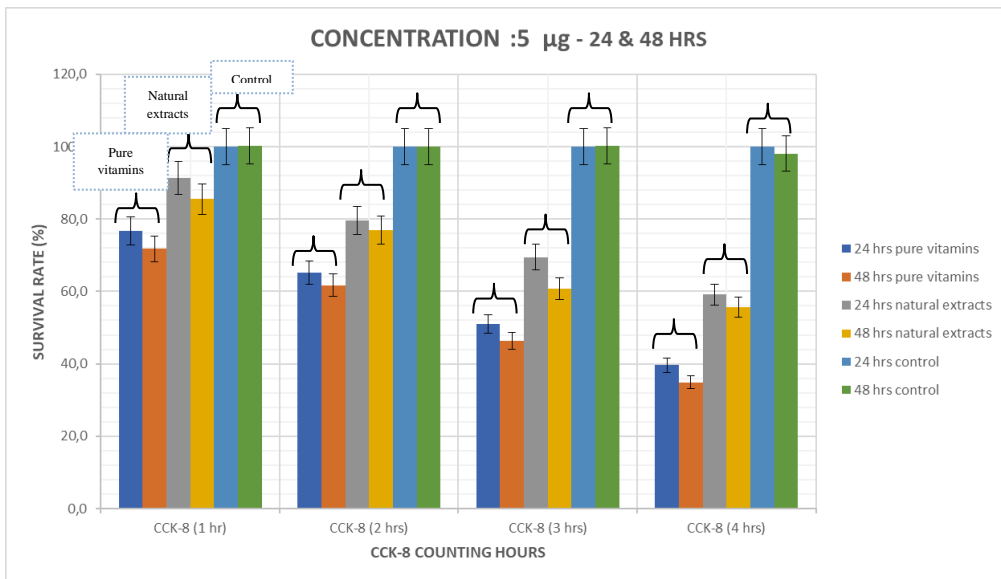
Σχήμα 9: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 24-48 ώρες με το μείγμα 1 (5µg) 1



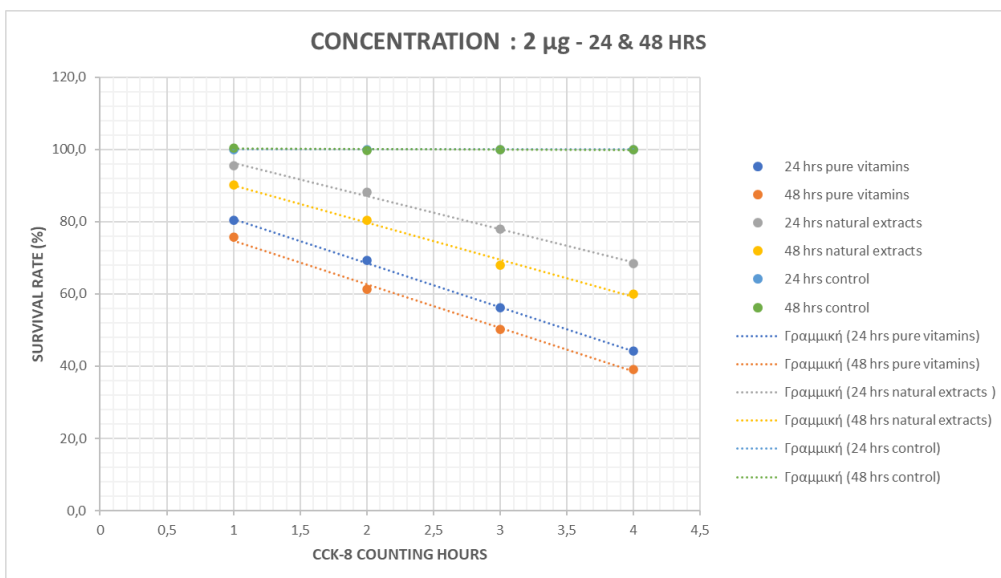
Σχήμα 10: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 24-48 ώρες με το μείγμα 1 (5 μ g) 2



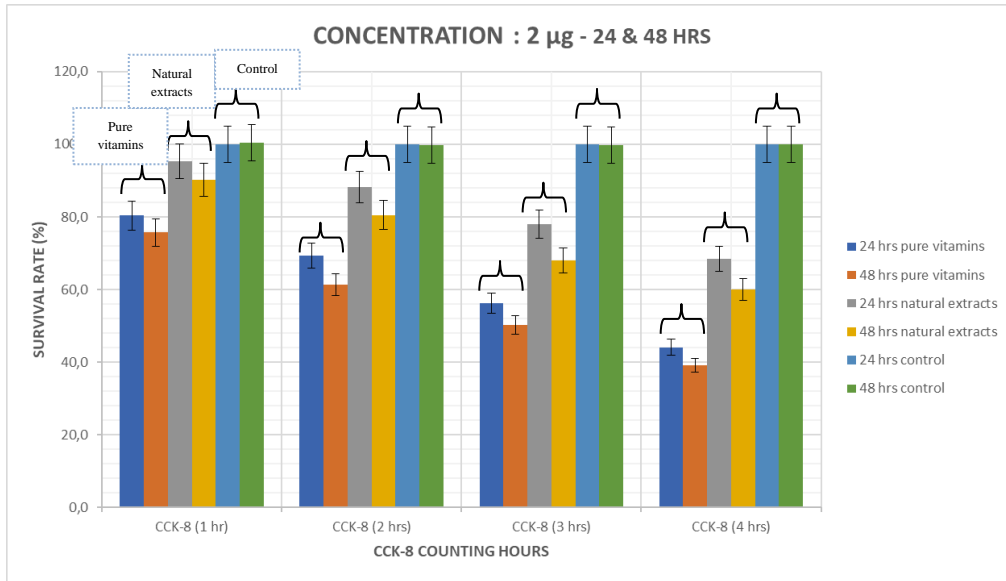
Σχήμα 11: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 24-48 ώρες με το μείγμα 2 (5 μ g) 1



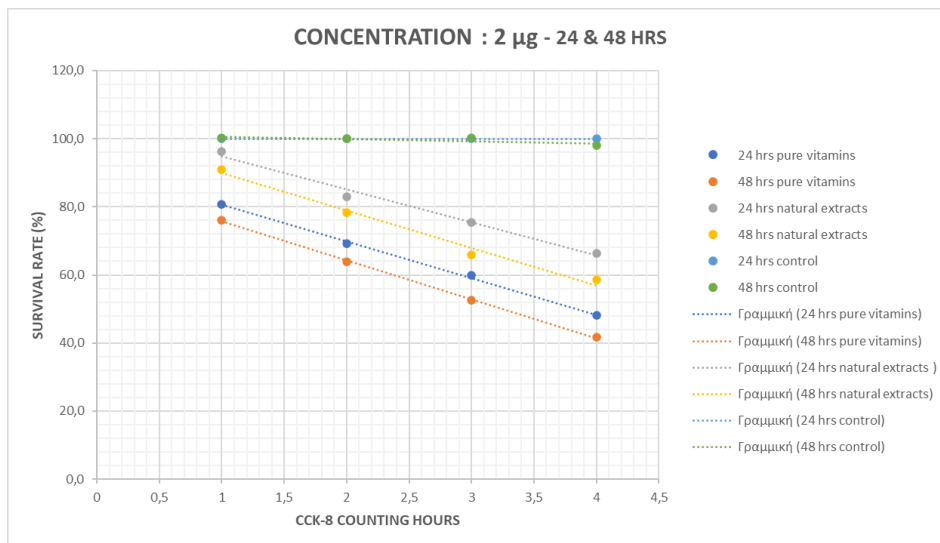
Σχήμα 12: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 24-48 ώρες με το μείγμα 2 (5µg) 2



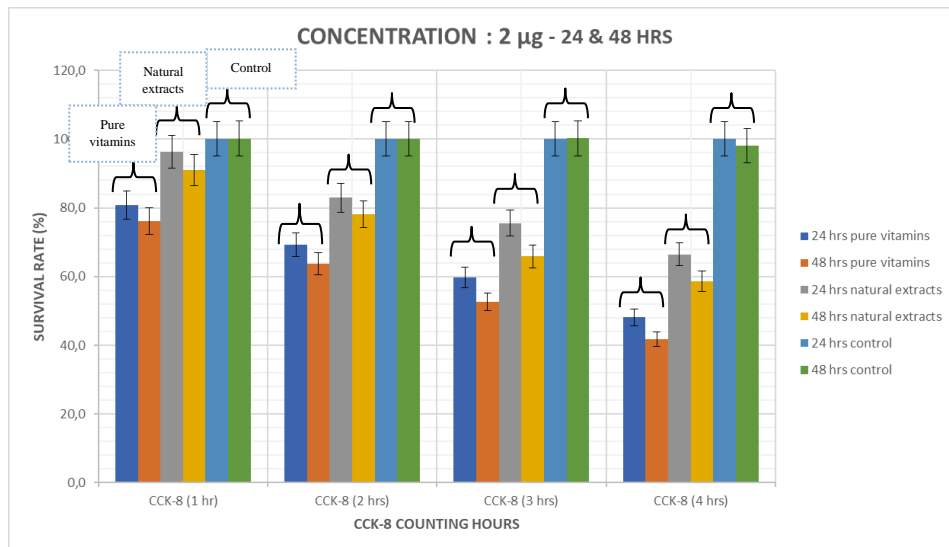
Σχήμα 13: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 24-48 ώρες με το μείγμα 1 (2µg) 1



Σχήμα 14: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 24-48 ώρες με το μείγμα 1 (2 μ g) 2



Σχήμα 15: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 24-48 ώρες με το μείγμα 2 (2 μ g) 1



Σχήμα 16: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 24-48 ώρες με το μείγμα 2 (2µg) 2

3.1.3 ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ (CCK-8 ASSAY) – ΧΡΟΝΟΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Η κυτταρική σειρά HepG2 επώαστηκε με τα αντιοξειδωτικά ως φυσικά εκχυλίσματα και ως καθαρές βιταμίνες ξεχωριστά, όπως επίσης έγινε και διαχωρισμός ως προς το βελτιωτικό γεύσης των ελαιοκαρπών (σοκολάτα ή κρέμα-μπανάνα). Η δοκιμασία CCK-8 με σκοπό τον υπολογισμό της βιωσιμότητας λόγω της έκθεσης με την δραστική έγινε για χρονικό διάστημα 24-120 ωρών. Η συγκέντρωση της δραστικής που χρησιμοποιήθηκε ήταν τα 10µg σύμφωνα με το δοσοεξαρτώμενο πείραμα που προηγήθηκε. Κάθε χρόνος επώασης είχε τρία αντίγραφα σε κάθε πειραματική πορεία και κάθε πορεία πραγματοποιήθηκε για τρεις βιολογικές επαναλήψεις για την διασφάλιση της ορθότητας των αποτελεσμάτων. Η βιωσιμότητα των κυττάρων συγκρίθηκε με την συγκέντρωση του control δείγματος, το οποίο αποτελούνταν μόνο από θρεπτικό υλικό (RPMI-1640+10%FBS+1%PS) και κύτταρα με σταθερή συγκέντρωση 8000/well.

Από τα δεδομένα που παραθέτονται παρακάτω στους πίνακες και στα διαγράμματα που προέκυψαν από το συγκεκριμένο πείραμα παρατηρούμε ότι υπάρχει μια σταδιακή και ομαλή μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων με την πάροδο του χρόνου μεταξύ 24 και 120 ωρών. Αυτό αποδεικνύει ότι τα αντιοξειδωτικά που

χρησιμοποιήθηκαν εμφανίζουν ήπια κυτταροτοξικότητα στην συγκεκριμένη κυτταρική σειρά, στο συγκεκριμένο χρονικό διάστημα και για τις συγκεκριμένες δοσολογίες. Ωστόσο, παρατηρείται μια διαφορά στα ποσοστά όσον αφορά την μορφή με την οποία είναι τα αντιοξειδωτικά. Δηλαδή, τα αντιοξειδωτικά με μορφή καθαρών βιταμινών εμφανίζουν σημαντικότερη κυτταροτοξικότητα σε σύγκριση με τα αντιοξειδωτικά με μορφή φυσικών εκχυλισμάτων. Όσον αφορά την γέμιση που χρησιμοποιήθηκε δεν παρατηρούμε κάποια σημαντική διαφορά.

24 HRS SURVIVAL RATE (%)					
	API concentrator	CCK-8 (1 hr)	CCK-8 (2 hrs)	CCK-8 (3 hrs)	CCK-8 (4 hrs)
pure vitamins	10 µg	80,8	75,3	62,2	57,3
natural extracts	10 µg	93,6	90,1	85,1	70,1

Πίνακας 12: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 24 ωρών με το μείγμα 1 (χρονο-εξαρτώμενο)

24 HRS SURVIVAL RATE (%)					
	API concentrator	CCK-8 (1 hr)	CCK-8 (2 hrs)	CCK-8 (3 hrs)	CCK-8 (4 hrs)
pure vitamins	10 µg	82,1	77,2	63,5	57,6
natural extracts	10 µg	92,3	88,9	83,9	72,0

Πίνακας 13: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 24 ωρών με το μείγμα 2 (χρονο-εξαρτώμενο)

24 HRS SURVIVAL RATE (%)					
	API concentrator	CCK-8 (1 hr)	CCK-8 (2 hrs)	CCK-8 (3 hrs)	CCK-8 (4 hrs)
CONTROL	0 µg	100,0	99,4	100,4	100,0

Πίνακας 14: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης της καλλιέργειας control για διάστημα 24 ωρών(χρονο-εξαρτώμενο)

48 HRS SURVIVAL RATE (%)					
	API concentrator	CCK-8 (1 hr)	CCK-8 (2 hrs)	CCK-8 (3 hrs)	CCK-8 (4 hrs)
pure vitamins	10 µg	70,3	62,6	55,3	51,6
natural extracts	10 µg	84,9	71,6	66,0	59,8

Πίνακας 15: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 48 ωρών με το μείγμα 1 (χρονο-εξαρτώμενο)

48 HRS SURVIVAL RATE (%)					
	API concentrator	CCK-8 (1 hr)	CCK-8 (2 hrs)	CCK-8 (3 hrs)	CCK-8 (4 hrs)
pure vitamins	10 µg	71,4	63,5	56,2	50,7
natural extracts	10 µg	86,5	73,9	67,5	61,4

Πίνακας 16: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 48 ωρών με το μείγμα 2 (χρονο-εξαρτώμενο)

48 HRS SURVIVAL RATE (%)					
	API concentrator	CCK-8 (1 hr)	CCK-8 (2 hrs)	CCK-8 (3 hrs)	CCK-8 (4 hrs)
CONTROL	0 µg	100,0	100,3	99,8	100,0

Πίνακας 17: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης καλλιέργειας control για διάστημα 48 ωρών (χρονο-εξαρτώμενο)

72 HRS SURVIVAL RATE (%)					
	API concentrator	CCK-8 (1 hr)	CCK-8 (2 hrs)	CCK-8 (3 hrs)	CCK-8 (4 hrs)
pure vitamins	10 µg	54,5	50,3	40,6	35,4
natural extracts	10 µg	65,1	58,0	55,1	45,0

Πίνακας 18: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 72 ωρών με το μείγμα 1 (χρονο-εξαρτώμενο)

72 HRS SURVIVAL RATE (%)					
	API concentrator	CCK-8 (1 hr)	CCK-8 (2 hrs)	CCK-8 (3 hrs)	CCK-8 (4 hrs)
pure vitamins	10 µg	56,1	51,6	42,3	37,5
natural extracts	10 µg	66,7	60,0	56,5	47,3

Πίνακας 19: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 72 ωρών με το μείγμα 2 (χρονο-εξαρτώμενο)

72 HRS SURVIVAL RATE (%)					
	API concentrator	CCK-8 (1 hr)	CCK-8 (2 hrs)	CCK-8 (3 hrs)	CCK-8 (4 hrs)
CONTROL	0 µg	100,0	100,0	100,0	99,9

Πίνακας 20: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης καλλιέργειας control για διάστημα 72 ωρών (χρονο-εξαρτώμενο)

96 HRS SURVIVAL RATE (%)					
	API concentrator	CCK-8 (1 hr)	CCK-8 (2 hrs)	CCK-8 (3 hrs)	CCK-8 (4 hrs)
pure vitamins	10 µg	48,3	40,1	36,5	30,3
natural extracts	10 µg	55,4	45,2	39,7	35,5

Πίνακας 21: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 96 ωρών με το μείγμα 1 (χρονο-εξαρτώμενο)

96 HRS SURVIVAL RATE (%)					
	API concentrator	CCK-8 (1 hr)	CCK-8 (2 hrs)	CCK-8 (3 hrs)	CCK-8 (4 hrs)
pure vitamins	10 µg	50,0	41,7	32,4	28,1
natural extracts	10 µg	55,8	44,7	38,6	29,8

Πίνακας 22: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 96 ωρών με το μείγμα 2 (χρονο-εξαρτώμενο)

96 HRS SURVIVAL RATE (%)					
	API concentrator	CCK-8 (1 hr)	CCK-8 (2 hrs)	CCK-8 (3 hrs)	CCK-8 (4 hrs)
CONTROL	0 µg	100,0	99,9	100,1	100,0

Πίνακας 23: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης καλλιέργειας control για διάστημα 96 ωρών (χρονο-εξαρτώμενο)

120 HRS SURVIVAL RATE (%)					
	API concentrator	CCK-8 (1 hr)	CCK-8 (2 hrs)	CCK-8 (3 hrs)	CCK-8 (4 hrs)
pure vitamins	10 µg	32,5	29,6	25,4	20,8
natural extracts	10 µg	47,2	40,1	34,3	29,6

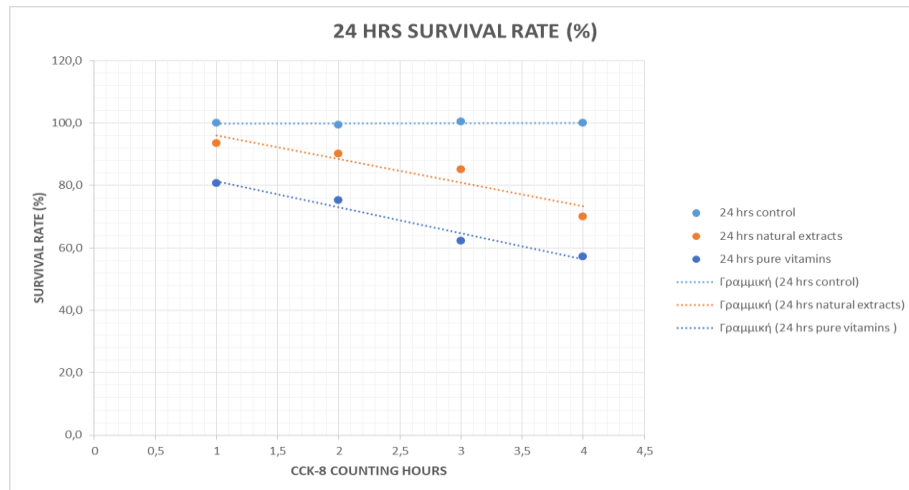
Πίνακας 24: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 120 ωρών με το μείγμα 1 (χρονο-εξαρτώμενο)

120 HRS SURVIVAL RATE (%)					
	API concentrator	CCK-8 (1 hr)	CCK-8 (2 hrs)	CCK-8 (3 hrs)	CCK-8 (4 hrs)
pure vitamins	10 µg	46,5	35,0	28,3	21,1
natural extracts	10 µg	50,2	39,4	33,2	25,1

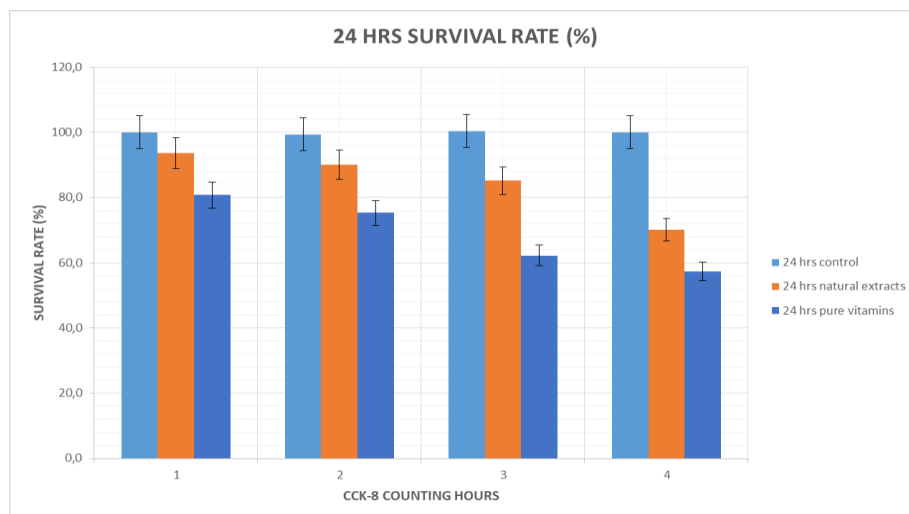
Πίνακας 25: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 120 ωρών με το μείγμα 2 (χρονο-εξαρτώμενο)

120 HRS SURVIVAL RATE (%)					
	API concentr	CCK-8 (1 hr)	CCK-8 (2 hrs)	CCK-8 (3 hrs)	CCK-8 (4 hrs)
CONTROL	0 μg	100,2	100,0	99,9	100,0

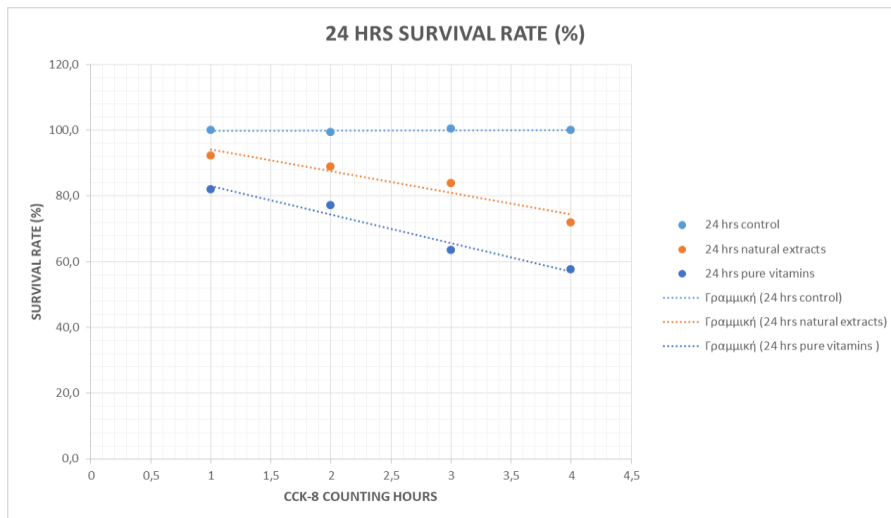
Πίνακας 26: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης καλλιέργειας control για διάστημα 120 ωρών (χρονο-εξαρτώμενο)



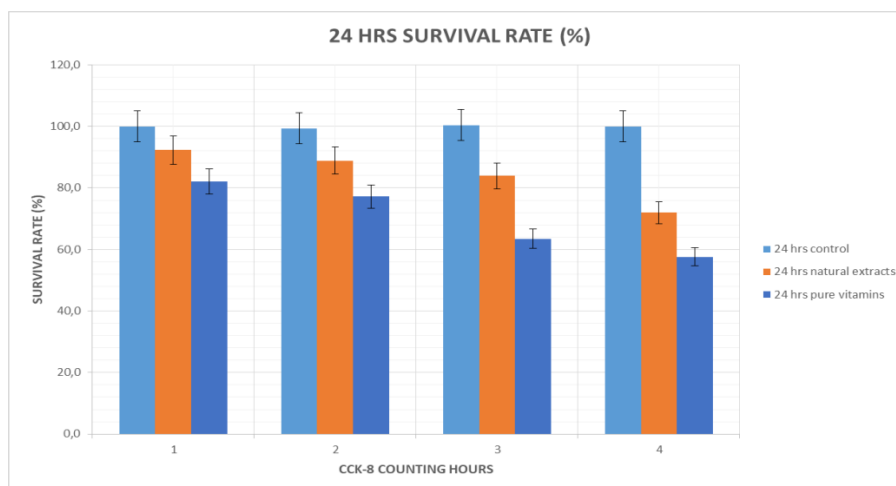
Σχήμα 17: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 24 ωρών με το μείγμα 1 (χρονο-εξαρτώμενο)1



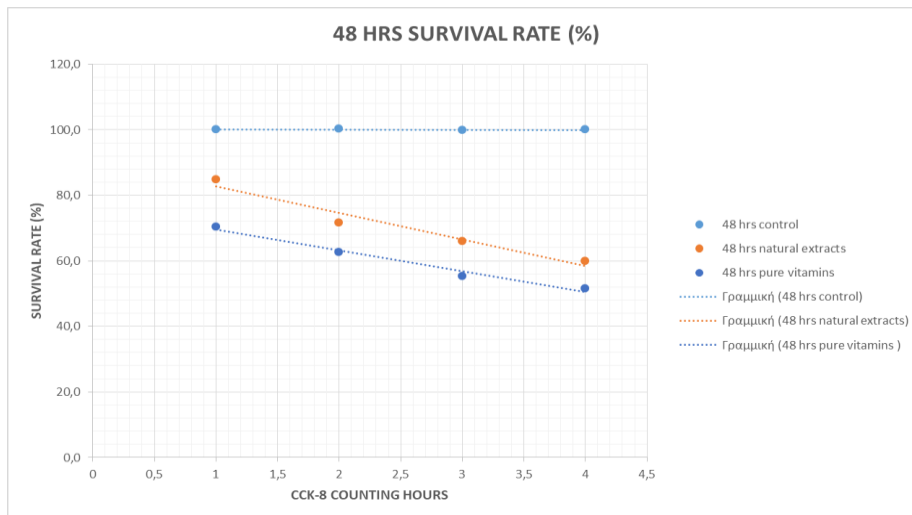
Σχήμα 18: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 24 ωρών με το μείγμα 1 (χρονο-εξαρτώμενο) 2



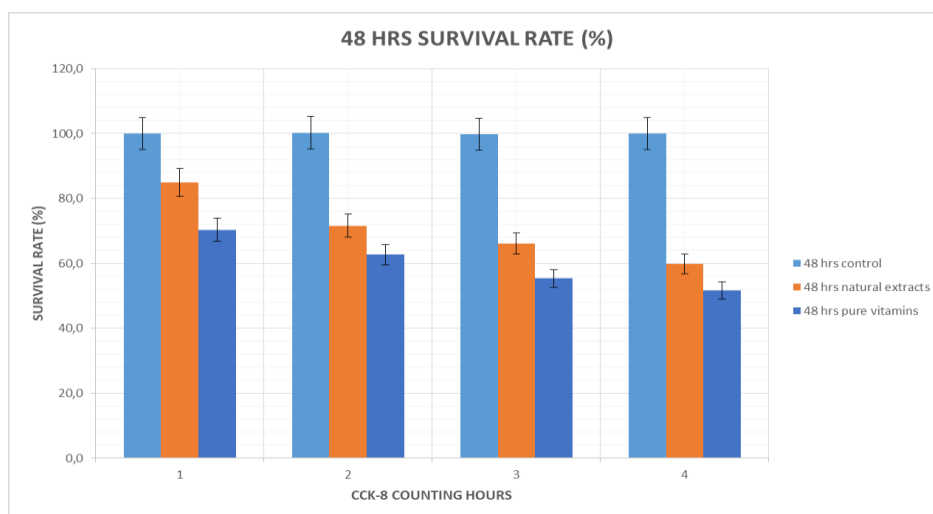
Σχήμα 19: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 24 ωρών με το μείγμα 2 (χρονο-εξαρτώμενο) 1



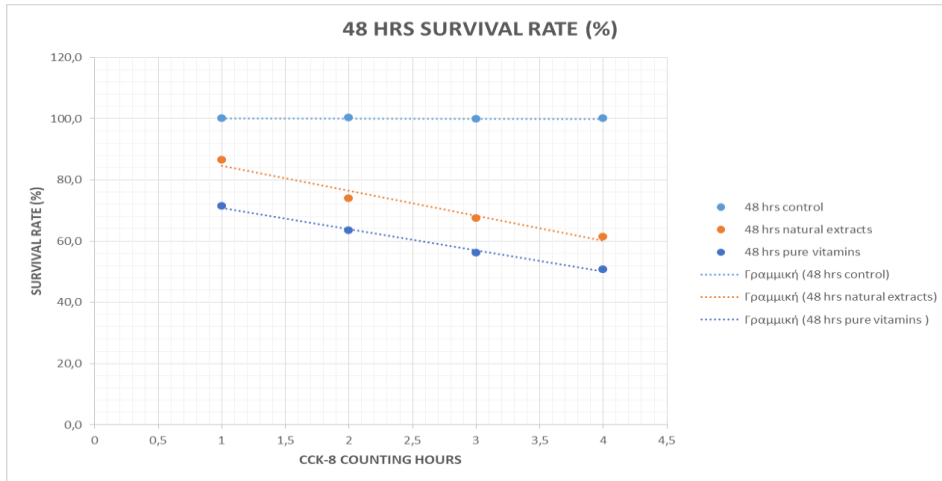
Σχήμα 20: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 24 ωρών με το μείγμα 2 (χρονο-εξαρτώμενο) 2



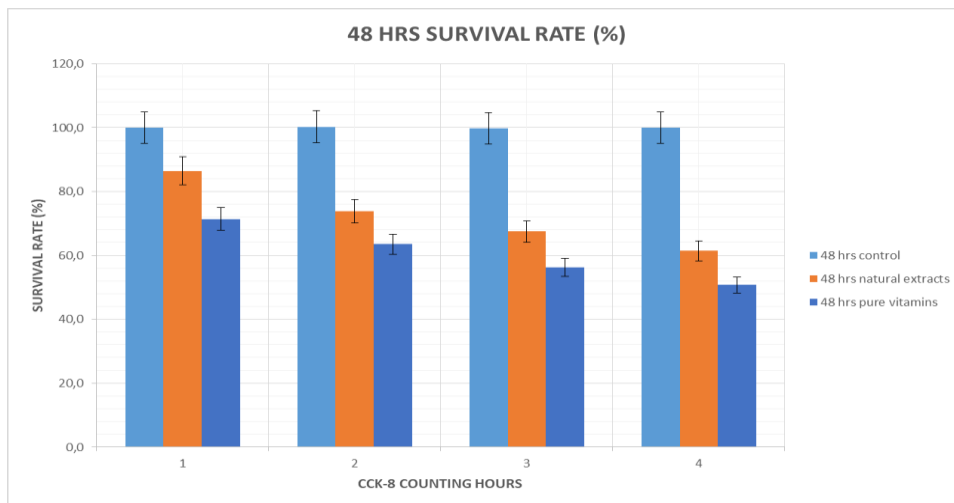
Σχήμα 21: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 48 ωρών με το μείγμα 1 (χρονο-εξαρτώμενο) 1



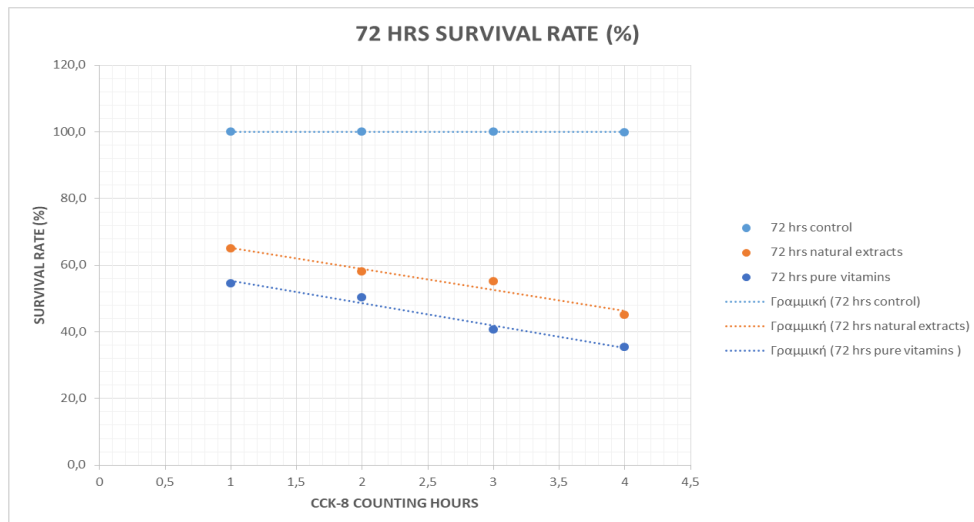
Σχήμα 22: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 48 ωρών με το μείγμα 1 (χρονο-εξαρτώμενο) 2



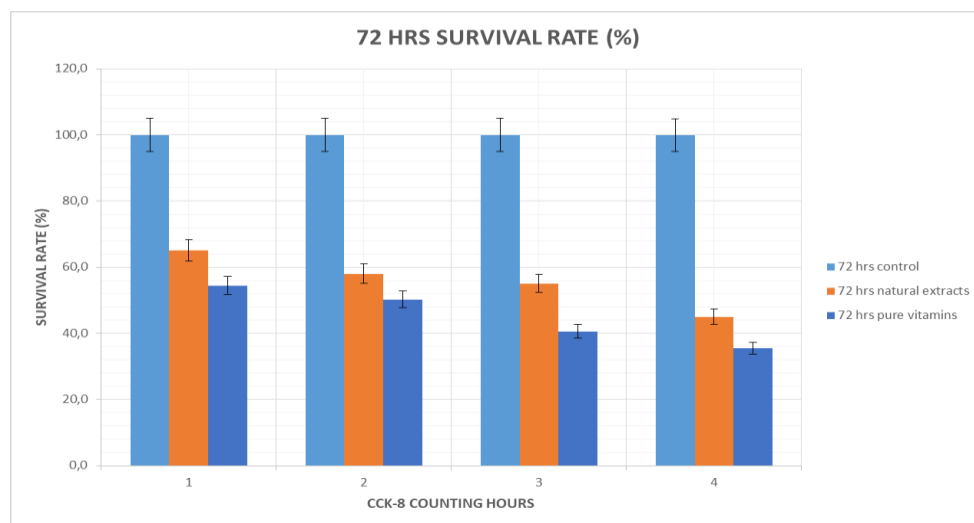
Σχήμα 23: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 48 ωρών με το μείγμα 2 (χρονο-εξαρτώμενο) 1



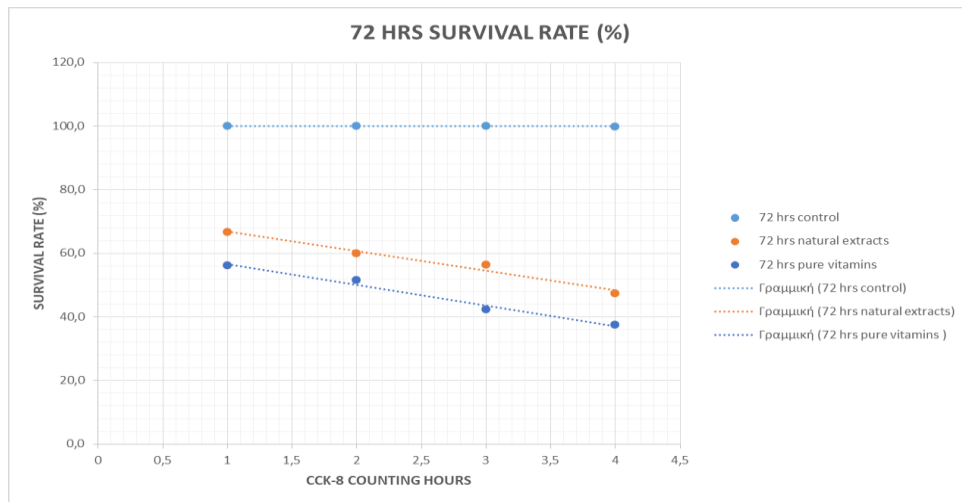
Σχήμα 24: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 48 ωρών με το μείγμα 2 (χρονο-εξαρτώμενο) 2



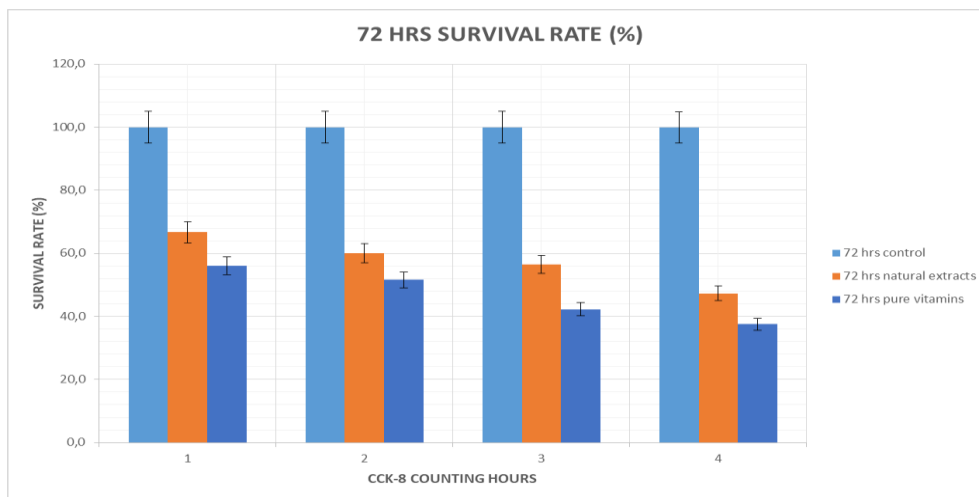
Σχήμα 25: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 72 ωρών με το μείγμα 1 (χρονο-εξαρτώμενο) 1



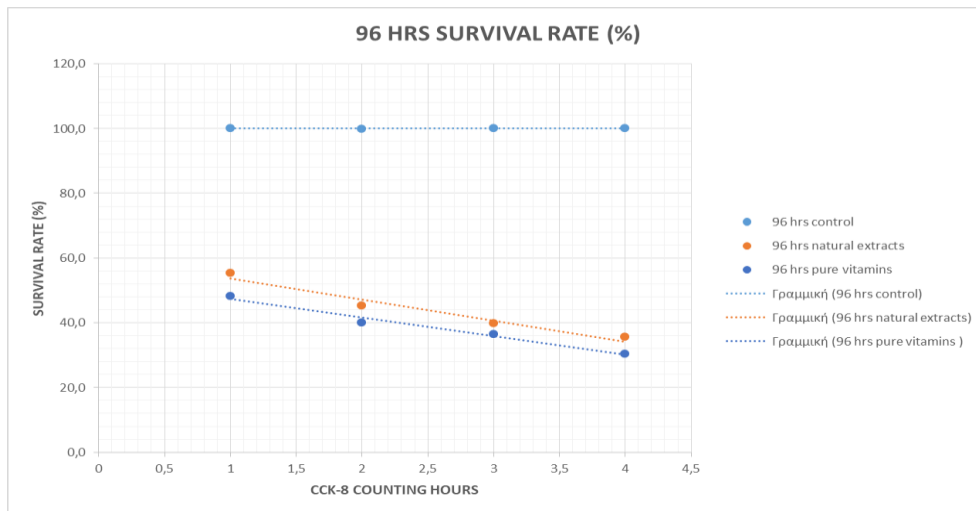
Σχήμα 26: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 72 ωρών με το μείγμα 1 (χρονο-εξαρτώμενο) 2



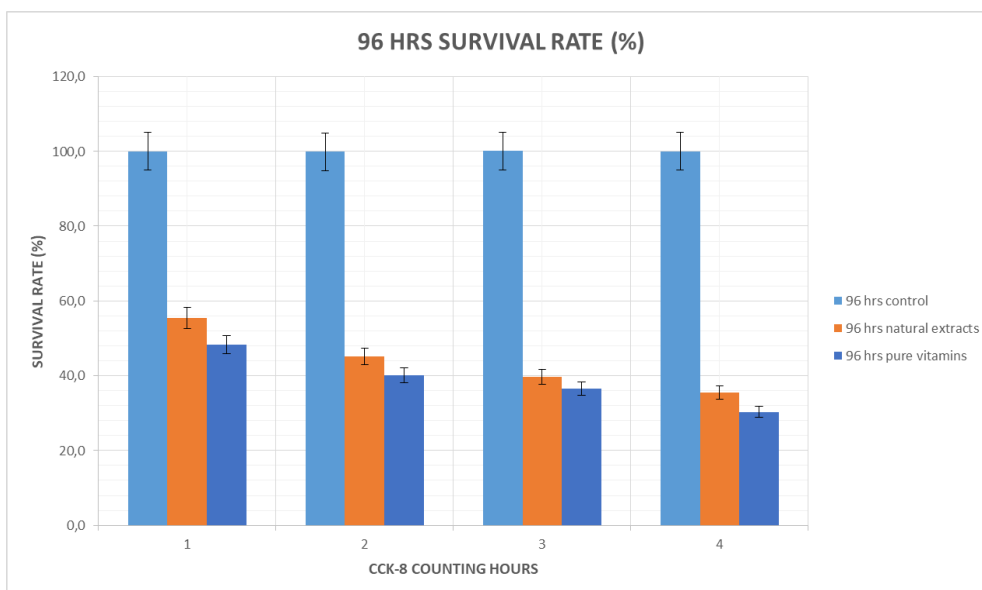
Σχήμα 27: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 72 ωρών με το μείγμα 2 (χρονο-εξαρτώμενο) 1



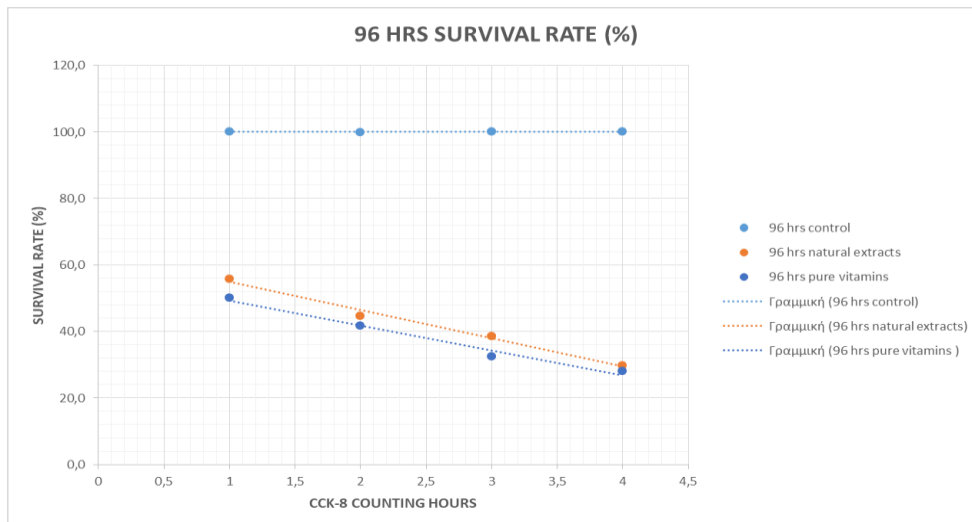
Σχήμα 28: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 72 ωρών με το μείγμα 2 (χρονο-εξαρτώμενο) 2



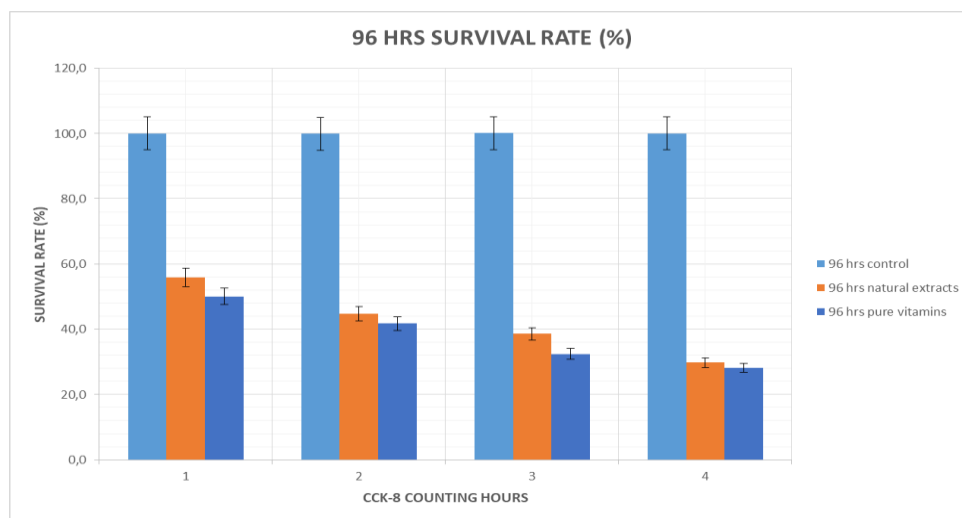
Σχήμα 29: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 96 ωρών με το μείγμα 1 (χρονο-εξαρτώμενο) 1



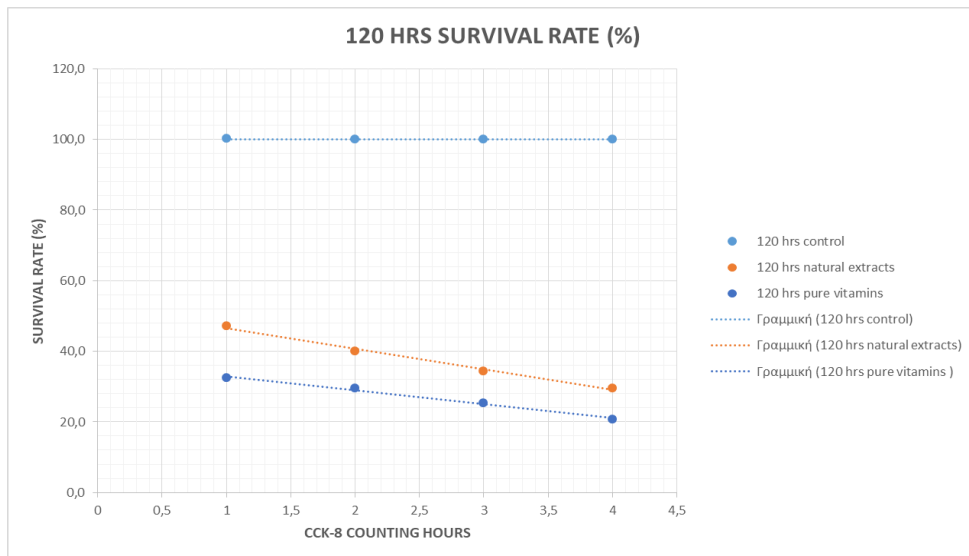
Σχήμα 30: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 96 ωρών με το μείγμα 1 (χρονο-εξαρτώμενο) 2



Σχήμα 31: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 96 ωρών με το μείγμα 2 (χρονο-εξαρτώμενο) 1



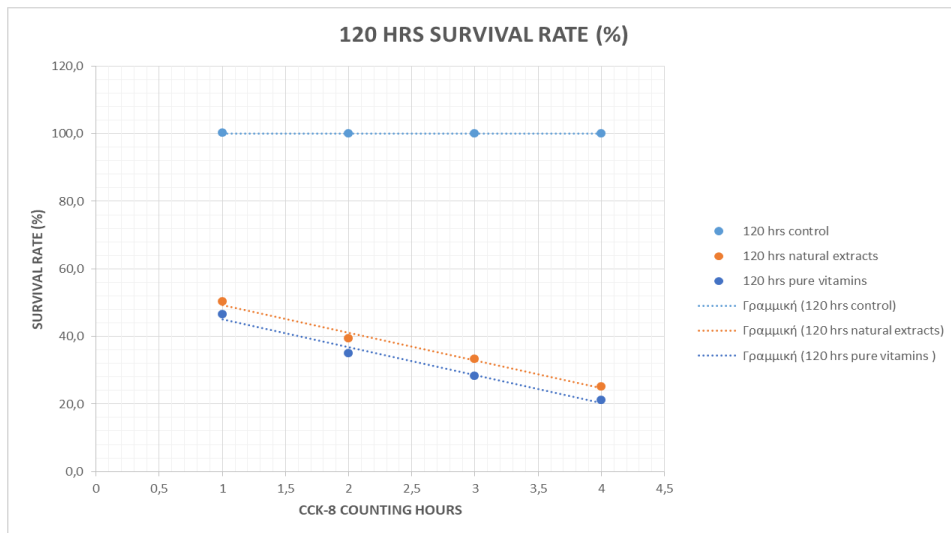
Σχήμα 32: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 96 ωρών με το μείγμα 2 (χρονο-εξαρτώμενο) 2



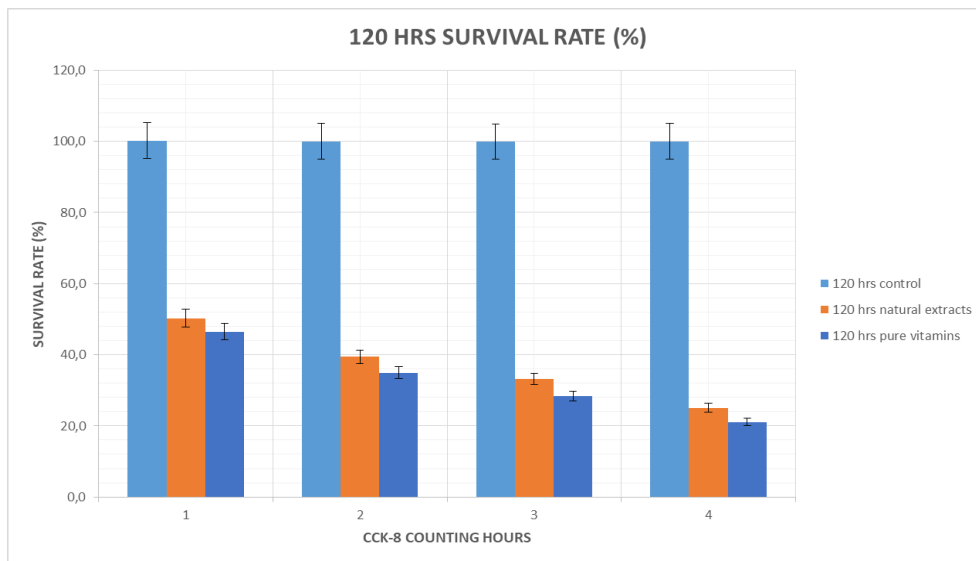
Σχήμα 33: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 120 ωρών με το μείγμα 1 (χρονο-εξαρτώμενο) 1



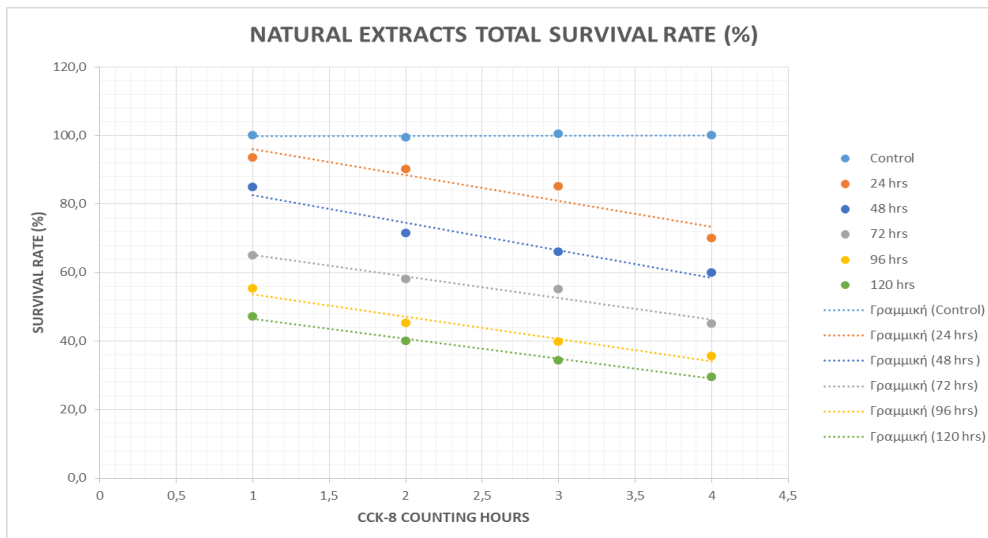
Σχήμα 34: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 120 ωρών με το μείγμα 1 (χρονο-εξαρτώμενο) 2



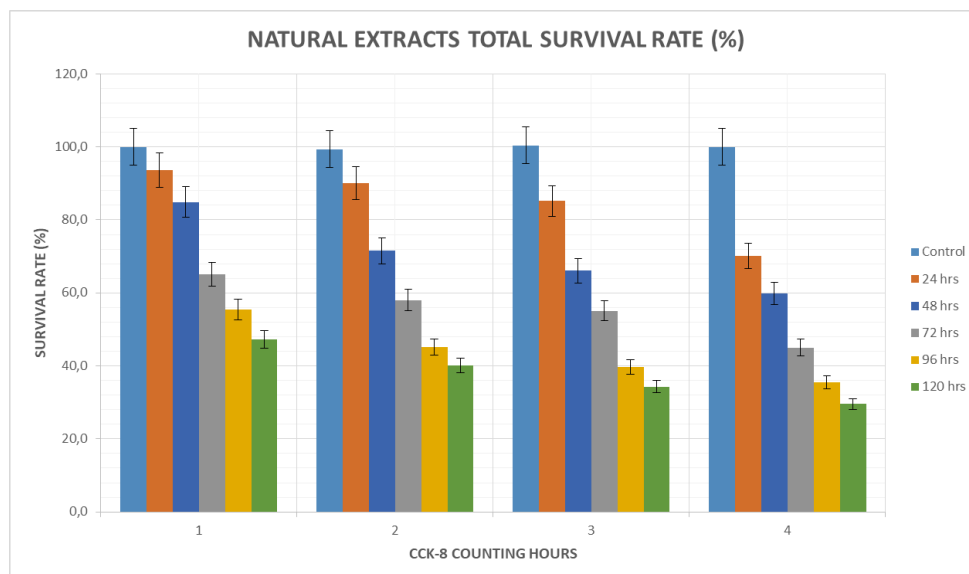
Σχήμα 35: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 120 ωρών με το μείγμα 2 (χρονο-εξαρτώμενο) 1



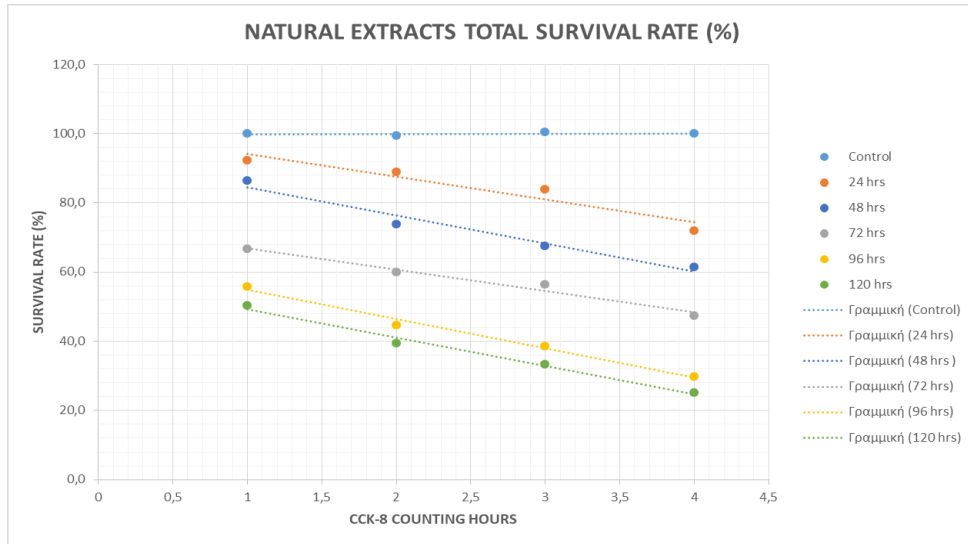
Σχήμα 36: Ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση για χρονικό διάστημα 120 ωρών με το μείγμα 2 (χρονο-εξαρτώμενο) 2



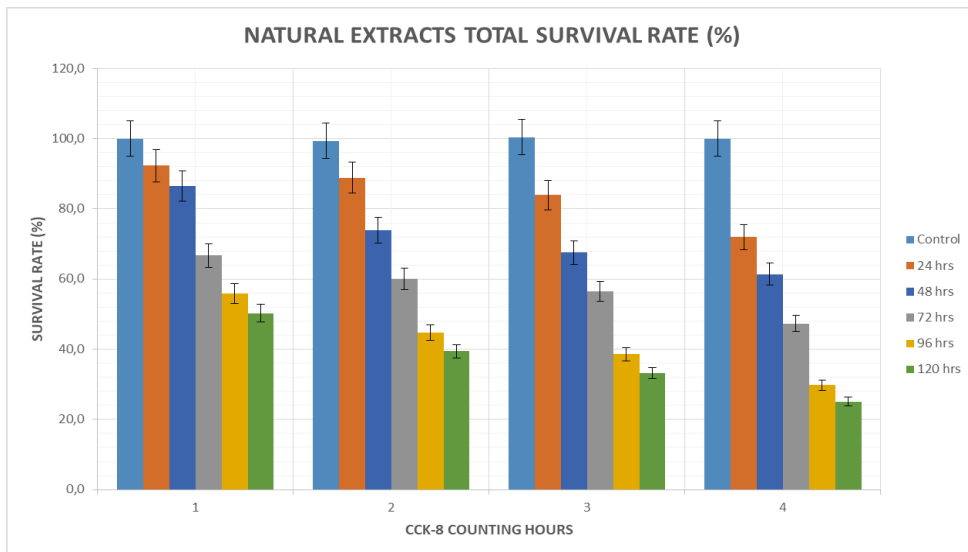
Σχήμα 37: Συνολική αξιολόγηση της κυτταρικής επιβίωσης παρουσία των φυσικών εκχυλισμάτων (μείγμα 1) 1



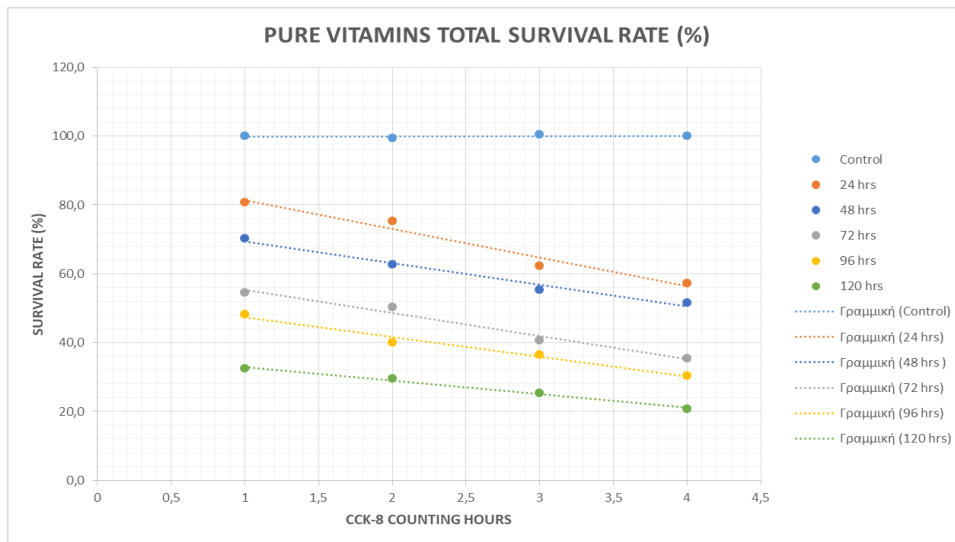
Σχήμα 38: Συνολική αξιολόγηση της κυτταρικής επιβίωσης παρουσία των φυσικών εκχυλισμάτων (μείγμα 1) 2



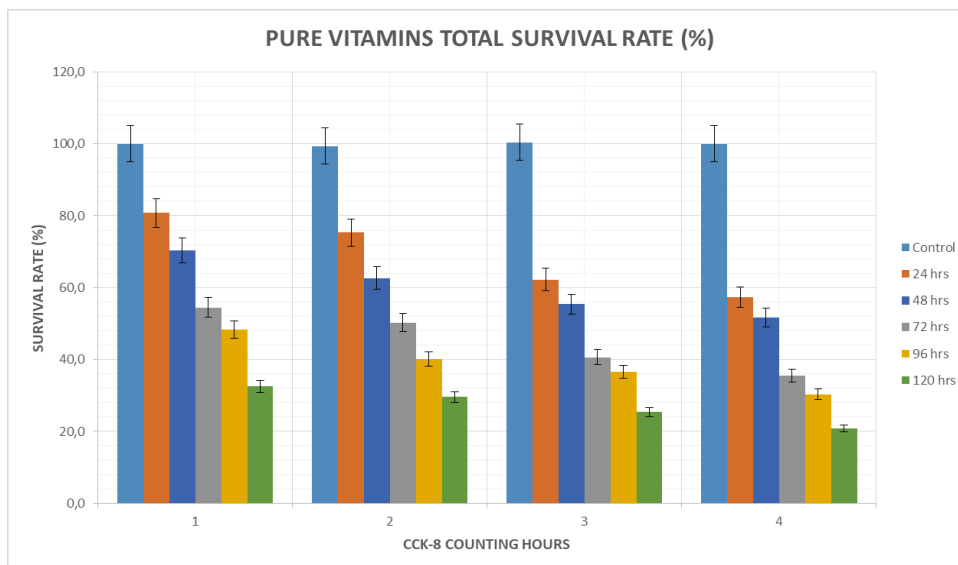
Σχήμα 39: Συνολική αξιολόγηση της κυτταρικής επιβίωσης παρουσία των φυσικών εκχυλισμάτων (μείγμα 2) 1



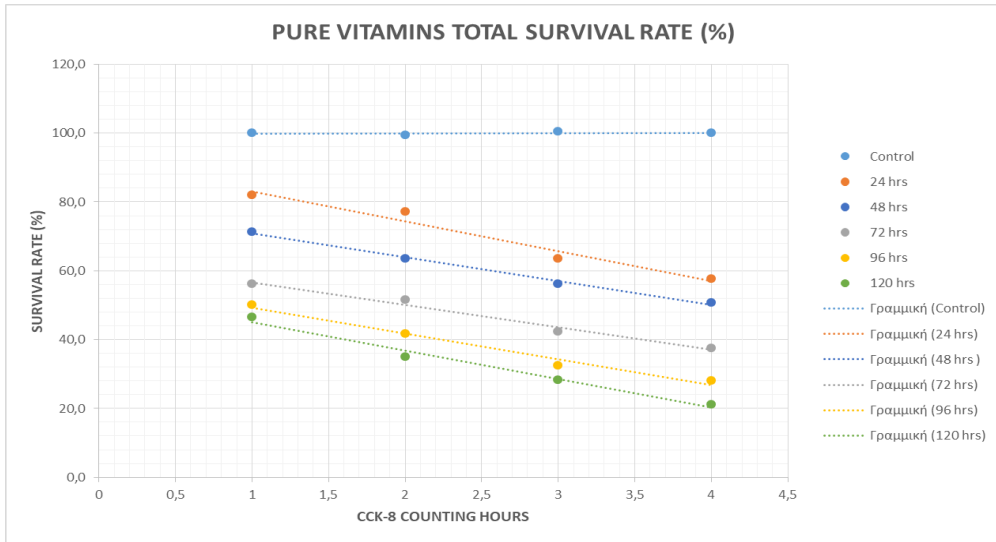
Σχήμα 40: Συνολική αξιολόγηση της κυτταρικής επιβίωσης παρουσία των φυσικών εκχυλισμάτων (μείγμα 2) 2



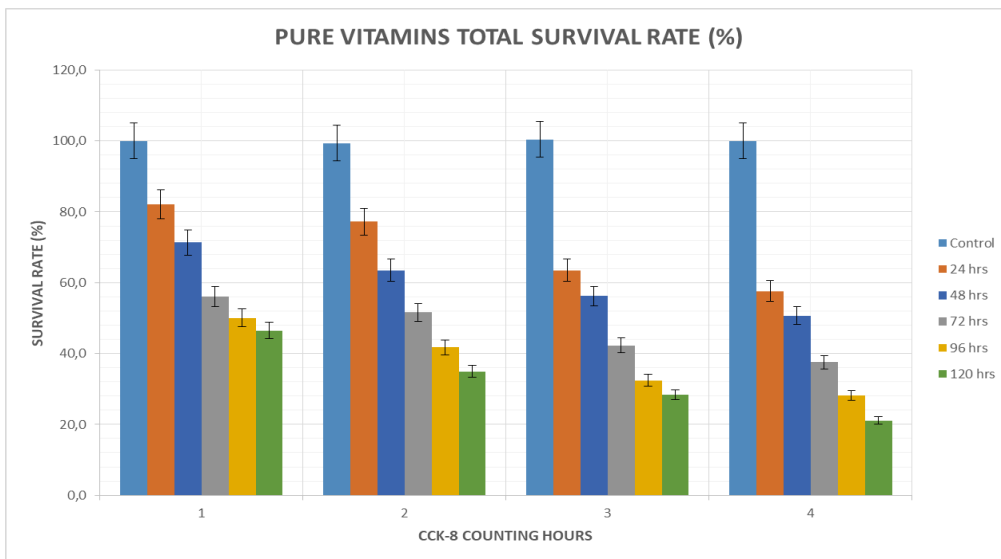
Σχήμα 41: Συνολική αξιολόγηση της κυτταρικής επιβίωσης παρουσία των καθαρών βιταμινών (μείγμα 1) 1



Σχήμα 42: Συνολική αξιολόγηση της κυτταρικής επιβίωσης παρουσία των καθαρών βιταμινών (μείγμα 1) 2



Σχήμα 43: Συνολική αξιολόγηση της κυτταρικής επιβίωσης παρουσία των καθαρών βιταμινών (μείγμα 2) 1



Σχήμα 44: Συνολική αξιολόγηση της κυτταρικής επιβίωσης παρουσία των καθαρών βιταμινών (μείγμα 2) 2

3.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕΣΩ REAL TIME QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-qPCR) ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥ RT2 Profiler PCR Array

Στα μείγματα που έγινε ο έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης και άρα η απομόνωση του ολικού RNA ήταν τα μείγματα που περιείχαν τα αντιοξειδωτικά με την μορφή των φυσικών εκχυλισμάτων, καθώς εμφάνισαν καλύτερα αποτελέσματα στα προηγούμενα πειράματα. Έτσι προκύπτουν τα παρακάτω αποτελέσματα:

Symbol	Well	samples			
		Control	Natural Extracts	Natural Extracts	AVG
			48hrs treatment cream banana(2A sample)	48hrs treatment chocolate(1A sample)	(Qiagen database)
ABCB1	A01	36,33	24,77	22,306	35
ABCB11	A02	Undetermined	Undetermined	Undetermined	35
ABCB4	A03	35,789	27,641	28,359	35
ABCC2	A04	32,882	22,416	20,867	32,88
ABCC3	A05	36,998	25,926	25,462	35
ALDOA	A06	30,07	19,923	17,158	30,07
APEX1	A07	31,705	22,117	22,412	31,71
ASAH1	A08	35,148	23,597	23,392	35
ATP8B1	A09	Undetermined	27,685	28,099	35
AVPR1A	A10	Undetermined	39,236	34,579	35
BHMT	A11	Undetermined	28,552	29,48	35
BTG2	A12	Undetermined	29,463	30,506	35
CA3	B01	Undetermined	31,074	30,682	35
CASP3	B02	34,145	24,415	24,405	34,15
CCNG1	B03	33,7	22,594	22,381	33,7
CD36	B04	35,634	28,798	28,612	35
CD68	B05	Undetermined	28,854	26,745	35
CDC14B	B06	34,454	25,634	24,976	34,45
CDKN1A	B07	32,92	23,564	21,133	32,92
COL4A1	B08	Undetermined	37,584	37,014	35
CRYL1	B09	34,315	24,281	26,421	34,32
CXCL12	B10	36,319	35,361	38,124	35
CYP1A2	B11	Undetermined	33,155	32,263	35

DDIT4L	B12	Undetermined	37,705	32,303	35
DDX39A	C01	Undetermined	25,709	23,65	35
DNAJB11	C02	34,549	23,558	22,55	34,55
DNAJC3	C03	34,286	25,236	24,051	34,29
FABP1	C04	29,164	19,615	22,622	29,16
FADS1	C05	35,362	24,469	25,908	35
EMC9	C06	34,733	24,452	24,616	34,73
FASN	C07	38,668	21,604	24,561	35
FMO1	C08	Undetermined	38,551	37,345	35
TIMM10B	C09	Undetermined	26,533	27,862	35
GADD45A	C10	37,758	25,856	23,225	35
GCLC	C11	35,328	24,692	22,086	35
GSR	C12	35,521	25,526	26,435	35
HAO2	D01	39,225	33,847	35,424	35
HMOX1	D02	Undetermined	24,928	23,957	35
HPN	D03	35,841	25,041	25,787	35
HYOU1	D04	Undetermined	23,149	23,573	35
ICAM1	D05	34,98	22,931	22,989	34,98
IGFALS	D06	36,367	30,941	32,707	35
IL6ST	D07	31,805	22,969	22,24	31,81
IPO4	D08	39,111	25,302	25,538	35
FAM214A	D09	Undetermined	27,791	26,575	35
KRT18	D10	30,725	20,898	19,232	30,73
KRT8	D11	35,251	23,859	22,924	35
L2HGDH	D12	Undetermined	27,576	29,725	35
LGR5	E01	Undetermined	23,594	22,973	35
LPL	E02	Undetermined	38,569	34,822	35
LSS	E03	Undetermined	24,224	27,622	35
MAOB	E04	Undetermined	25,741	25,981	35
MAP3K6	E05	39,246	28,862	29,664	35
MBL2	E06	37,492	27,654	29,512	35
MCM10	E07	Undetermined	27,46	28,984	35
MLXIPL	E08	37,473	24,639	28,168	35
MRPS18B	E09	36,818	26,109	26,11	35
NQO1	E10	30,989	20,53	20,944	30,99
NUS1	E11	Undetermined	24,371	25,005	35
OSMR	E12	33,343	24,642	22,527	33,34
SLC51A	F01	Undetermined	27,919	26,763	35
PDYN	F02	Undetermined	39,166	38,432	35
PLA2G12A	F03	33,416	25,637	26,613	33,42
PPARA	F04	38,801	25,11	25,9	35
PSME3	F05	33,808	23,393	24,208	33,81

PYGL	F06	35,922	24,086	23,459	35
RB1	F07	34,859	25,014	23,667	34,86
RDX	F08	34,349	24,415	23,143	34,35
RHBG	F09	35,174	25,084	28,564	35
S100A8	F10	Undetermined	Undetermined	Undetermined	35
SCD	F11	Undetermined	20,978	19,956	35
SERPINA3	F12	32,553	19,969	21,13	32,55
SERPINE1	G01	Undetermined	23,579	17,98	35
SKIL	G02	Undetermined	28,718	25,659	35
SLC17A3	G03	Undetermined	34,223	Undetermined	35
SLC2A3	G04	32,736	24,296	18,563	32,74
SLC39A6	G05	34,874	25,362	24,84	34,87
SREBF1	G06	37,406	26,675	25,995	35
TAGLN	G07	34,046	23,86	23,609	34,05
THRSP	G08	Undetermined	35,117	35,04	35
TMEM2	G09	36,961	23,805	22,194	35
TXNRD1	G10	35,578	23,19	20,289	35
WIPI1	G11	35,35	24,893	25,122	35
YRDC	G12	Undetermined	25,322	24,768	35
ACTB	H01	29,507	18,544	18,81	29,51
B2M	H02	32,47	22,013	21,42	32,47
GAPDH	H03	29,12	20,408	18,001	29,12
HPRT1	H04	36,249	25,133	23,947	35
RPLP0	H05	27,866	18,841	17,769	27,87
HGDC	H06	34,141	34,7	35,988	34,14
RTC	H07	21,542	21,761	22,607	21,54
RTC	H08	21,528	21,792	22,576	21,53
RTC	H09	21,533	21,789	22,522	21,53
PPC	H10	19,251	19,113	19,171	19,25
PPC	H11	19,126	18,969	18,973	19,13
PPC	H12	19,151	19,105	19,044	19,15

Πίνακας 27: Αποτελέσματα Ct όπως προσδιορίστηκαν με την κατάλληλη ανάλυση του πάνελ γονιδίων (Qiagen Data Analysis software)

Symbol	Well	AVG ΔC_t (Ct(GOI) - Ave Ct (HKG))		$2^{-\Delta C_t}$		Fold Change	Fold Up- or Down- Regulation	Comments
		Test Group	Control Group	Test Group	Control Group	Test Group /Control Group	Well /Test Group	
ABCB1	A01	3,782603	4,206951	7,3E-02	5,4E-02	1,34	1,34	A
ABCB11	A02	14,01166	4,206951	6,1E-05	5,4E-02	0,00	-894,36	C
ABCB4	A03	6,653333	4,206951	9,9E-03	5,4E-02	0,18	-5,45	A
ABCC2	A04	1,428483	2,089202	3,7E-01	2,4E-01	1,58	1,58	A
ABCC3	A05	4,938543	4,206951	3,3E-02	5,4E-02	0,60	-1,66	A
ALDOA	A06	-1,06529	-0,72245	2,1E+00	1,6E+00	1,27	1,27	A
APEX1	A07	1,129594	0,9127	4,6E-01	5,3E-01	0,86	-1,16	A
ASAH1	A08	2,609431	4,206951	1,6E-01	5,4E-02	3,03	3,03	A
ATP8B1	A09	6,697568	4,206951	9,6E-03	5,4E-02	0,18	-5,62	A
AVPR1A	A10	14,01166	4,206951	6,1E-05	5,4E-02	0,00	-894,36	C
BHMT	A11	7,564243	4,206951	5,3E-03	5,4E-02	0,10	-10,25	A
BTG2	A12	8,474694	4,206951	2,8E-03	5,4E-02	0,05	-19,26	A
CA3	B01	10,08642	4,206951	9,2E-04	5,4E-02	0,02	-58,87	B
CASP3	B02	3,4272	3,352638	9,3E-02	9,8E-02	0,95	-1,05	A
CCNG1	B03	1,605842	2,90707	3,3E-01	1,3E-01	2,46	2,46	A
CD36	B04	7,810262	4,206951	4,5E-03	5,4E-02	0,08	-12,15	A
CD68	B05	7,865775	4,206951	4,3E-03	5,4E-02	0,08	-12,63	A
CDC14B	B06	4,645801	3,661373	4,0E-02	7,9E-02	0,51	-1,98	A
CDKN1A	B07	2,576015	2,127727	1,7E-01	2,3E-01	0,73	-1,36	A
COL4A1	B08	14,01166	4,206951	6,1E-05	5,4E-02	0,00	-894,36	C
CRYL1	B09	3,293527	3,522342	1,0E-01	8,7E-02	1,17	1,17	A
CXCL12	B10	14,01166	4,206951	6,1E-05	5,4E-02	0,00	-894,36	C
CYP1A2	B11	12,16693	4,206951	2,2E-04	5,4E-02	0,00	-249,00	B
DDIT4L	B12	14,01166	4,206951	6,1E-05	5,4E-02	0,00	-894,36	C
DDX39A	C01	4,721118	4,206951	3,8E-02	5,4E-02	0,70	-1,43	A
DNAJB11	C02	2,569841	3,755985	1,7E-01	7,4E-02	2,28	2,28	A
DNAJC3	C03	4,248122	3,493232	5,3E-02	8,9E-02	0,59	-1,69	A
FABP1	C04	-1,37238	-1,62818	2,6E+00	3,1E+00	0,84	-1,19	OKAY
FADS1	C05	3,480861	4,206951	9,0E-02	5,4E-02	1,65	1,65	A
EMC9	C06	3,464	3,940162	9,1E-02	6,5E-02	1,39	1,39	A
FASN	C07	0,616031	4,206951	6,5E-01	5,4E-02	12,05	12,05	A
FMO1	C08	14,01166	4,206951	6,1E-05	5,4E-02	0,00	-894,36	C
TIMM10B	C09	5,545083	4,206951	2,1E-02	5,4E-02	0,40	-2,53	A
GADD45A	C10	4,867965	4,206951	3,4E-02	5,4E-02	0,63	-1,58	A
GCLC	C11	3,704507	4,206951	7,7E-02	5,4E-02	1,42	1,42	A
GSR	C12	4,538564	4,206951	4,3E-02	5,4E-02	0,79	-1,26	A
HAO2	D01	12,85897	4,206951	1,3E-04	5,4E-02	0,00	-402,27	B

HMOX1	D02	3,940541	4,206951	6,5E-02	5,4E-02	1,20	1,20	A
HPN	D03	4,053209	4,206951	6,0E-02	5,4E-02	1,11	1,11	A
HYOU1	D04	2,160678	4,206951	2,2E-01	5,4E-02	4,13	4,13	A
ICAM1	D05	1,942857	4,187553	2,6E-01	5,5E-02	4,74	4,74	A
IGFALS	D06	9,953296	4,206951	1,0E-03	5,4E-02	0,02	-53,68	B
IL6ST	D07	1,98093	1,012407	2,5E-01	5,0E-01	0,51	-1,96	A
IPO4	D08	4,314027	4,206951	5,0E-02	5,4E-02	0,93	-1,08	A
FAM214A	D09	6,803014	4,206951	9,0E-03	5,4E-02	0,17	-6,05	A
KRT18	D10	-0,08947	-0,06727	1,1E+00	1,0E+00	1,02	1,02	A
KRT8	D11	2,870988	4,206951	1,4E-01	5,4E-02	2,52	2,52	A
L2HGDH	D12	6,588031	4,206951	1,0E-02	5,4E-02	0,19	-5,21	A
LGR5	E01	2,606103	4,206951	1,6E-01	5,4E-02	3,03	3,03	A
LPL	E02	14,01166	4,206951	6,1E-05	5,4E-02	0,00	-894,36	C
LSS	E03	3,235894	4,206951	1,1E-01	5,4E-02	1,96	1,96	A
MAOB	E04	4,752759	4,206951	3,7E-02	5,4E-02	0,69	-1,46	A
MAP3K6	E05	7,874288	4,206951	4,3E-03	5,4E-02	0,08	-12,71	A
MBL2	E06	6,665851	4,206951	9,8E-03	5,4E-02	0,18	-5,50	A
MCM10	E07	6,471959	4,206951	1,1E-02	5,4E-02	0,21	-4,81	A
MLXIPL	E08	3,650859	4,206951	8,0E-02	5,4E-02	1,47	1,47	A
MRPS18B	E09	5,12116	4,206951	2,9E-02	5,4E-02	0,53	-1,88	A
NQO1	E10	-0,45783	0,196115	1,4E+00	8,7E-01	1,57	1,57	A
NUS1	E11	3,383138	4,206951	9,6E-02	5,4E-02	1,77	1,77	A
OSMR	E12	3,654004	2,550445	7,9E-02	1,7E-01	0,47	-2,15	A
SLC51A	F01	6,930747	4,206951	8,2E-03	5,4E-02	0,15	-6,61	A
PDYN	F02	14,01166	4,206951	6,1E-05	5,4E-02	0,00	-894,36	C
PLA2G12A	F03	4,649211	2,623336	4,0E-02	1,6E-01	0,25	-4,07	A
PPARA	F04	4,121747	4,206951	5,7E-02	5,4E-02	1,06	1,06	A
PSME3	F05	2,405467	3,015255	1,9E-01	1,2E-01	1,53	1,53	A
PYGL	F06	3,097842	4,206951	1,2E-01	5,4E-02	2,16	2,16	A
RB1	F07	4,026117	4,066593	6,1E-02	6,0E-02	1,03	1,03	A
RDX	F08	3,426851	3,556373	9,3E-02	8,5E-02	1,09	1,09	A
RHBG	F09	4,096568	4,206951	5,8E-02	5,4E-02	1,08	1,08	A
S100A8	F10	14,01166	4,206951	6,1E-05	5,4E-02	0,00	-894,36	C
SCD	F11	-0,00971	4,206951	1,0E+00	5,4E-02	18,59	18,59	A
SERPINA3	F12	-1,01885	1,759994	2,0E+00	3,0E-01	6,86	6,86	A
SERPINE1	G01	2,591579	4,206951	1,7E-01	5,4E-02	3,06	3,06	A
SKIL	G02	7,730386	4,206951	4,7E-03	5,4E-02	0,09	-11,50	A
SLC17A3	G03	13,23473	4,206951	1,0E-04	5,4E-02	0,00	-521,95	B
SLC2A3	G04	3,307704	1,943386	1,0E-01	2,6E-01	0,39	-2,57	A
SLC39A6	G05	4,374355	4,081081	4,8E-02	5,9E-02	0,82	-1,23	A
SREBF1	G06	5,68678	4,206951	1,9E-02	5,4E-02	0,36	-2,79	A

TAGLN	G07	2,871698	3,253784	1,4E-01	1,0E-01	1,30	1,30	A
THRSP	G08	14,01166	4,206951	6,1E-05	5,4E-02	0,00	-894,36	C
TMEM2	G09	2,817105	4,206951	1,4E-01	5,4E-02	2,62	2,62	A
TXNRD1	G10	2,201753	4,206951	2,2E-01	5,4E-02	4,01	4,01	A
WIPI1	G11	3,904666	4,206951	6,7E-02	5,4E-02	1,23	1,23	A
YRDC	G12	4,334541	4,206951	5,0E-02	5,4E-02	0,92	-1,09	A
ACTB	H01	-2,44372	-1,2851	5,4E+00	2,4E+00	2,23	2,23	OKAY
B2M	H02	1,025363	1,677223	4,9E-01	3,1E-01	1,57	1,57	A
GAPDH	H03	-0,5794	-1,67224	1,5E+00	3,2E+00	0,47	-2,13	OKAY
HPRT1	H04	4,144828	4,206951	5,7E-02	5,4E-02	1,04	1,04	A
RPLP0	H05	-2,14707	-2,92684	4,4E+00	7,6E+00	0,58	-1,72	OKAY

Πίνακας 28: Συνολικά αποτελέσματα RT-qPCR για μείγμα 2A.

Symbol	Well	AVG ΔC_t (Ct(GOI) - Ave Ct (HKG))		$2^{-\Delta C_t}$		Fold Change	Fold Up- or Down- Regulation	Comments
		Test Group	Control Group	Test Group	Control Group	Test Group /Control Group	Well /Test Group	
ABCB1	A01	2,32	4,21	2,0E-01	5,4E-02	3,71	3,71	A
ABCB11	A02	15,01	4,21	3,0E-05	5,4E-02	0,00	-1786,72	C
ABCB4	A03	8,37	4,21	3,0E-03	5,4E-02	0,06	-17,91	A
ABCC2	A04	0,88	2,09	5,4E-01	2,4E-01	2,32	2,32	A
ABCC3	A05	5,47	4,21	2,3E-02	5,4E-02	0,42	-2,40	A
ALDOA	A06	-2,83	-0,72	7,1E+00	1,6E+00	4,31	4,31	A
APEX1	A07	2,42	0,91	1,9E-01	5,3E-01	0,35	-2,85	A
ASAH1	A08	3,40	4,21	9,5E-02	5,4E-02	1,75	1,75	A
ATP8B1	A09	8,11	4,21	3,6E-03	5,4E-02	0,07	-14,95	A
AVPR1A	A10	14,59	4,21	4,1E-05	5,4E-02	0,00	-1334,85	B
BHMT	A11	9,49	4,21	1,4E-03	5,4E-02	0,03	-38,94	A
BTG2	A12	10,52	4,21	6,8E-04	5,4E-02	0,01	-79,31	B
CA3	B01	10,69	4,21	6,0E-04	5,4E-02	0,01	-89,60	B
CASP3	B02	4,42	3,35	4,7E-02	9,8E-02	0,48	-2,09	A
CCNG1	B03	2,39	2,91	1,9E-01	1,3E-01	1,43	1,43	A
CD36	B04	8,62	4,21	2,5E-03	5,4E-02	0,05	-21,35	A
CD68	B05	6,76	4,21	9,3E-03	5,4E-02	0,17	-5,85	A
CDC14B	B06	4,99	3,66	3,2E-02	7,9E-02	0,40	-2,50	A
CDKN1A	B07	1,14	2,13	4,5E-01	2,3E-01	1,98	1,98	A
COL4A1	B08	15,01	4,21	3,0E-05	5,4E-02	0,00	-1786,72	C
CRYL1	B09	6,43	3,52	1,2E-02	8,7E-02	0,13	-7,51	A

CXCL12	B10	15,01	4,21	3,0E-05	5,4E-02	0,00	-1786,72	C
CYP1A2	B11	12,27	4,21	2,0E-04	5,4E-02	0,00	-268,12	B
DDIT4L	B12	12,31	4,21	2,0E-04	5,4E-02	0,00	-275,65	B
DDX39A	C01	3,66	4,21	7,9E-02	5,4E-02	1,46	1,46	A
DNAJB11	C02	2,56	3,76	1,7E-01	7,4E-02	2,29	2,29	A
DNAJC3	C03	4,06	3,49	6,0E-02	8,9E-02	0,67	-1,48	A
FABP1	C04	2,63	-1,63	1,6E-01	3,1E+00	0,05	-19,16	OKAY
FADS1	C05	5,92	4,21	1,7E-02	5,4E-02	0,31	-3,28	A
EMC9	C06	4,63	3,94	4,0E-02	6,5E-02	0,62	-1,61	A
FASN	C07	4,57	4,21	4,2E-02	5,4E-02	0,78	-1,29	A
FMO1	C08	15,01	4,21	3,0E-05	5,4E-02	0,00	-1786,72	C
TIMM10B	C09	7,87	4,21	4,3E-03	5,4E-02	0,08	-12,69	A
GADD45A	C10	3,24	4,21	1,1E-01	5,4E-02	1,96	1,96	A
GCLC	C11	2,10	4,21	2,3E-01	5,4E-02	4,32	4,32	A
GSR	C12	6,45	4,21	1,1E-02	5,4E-02	0,21	-4,72	A
HAO2	D01	15,01	4,21	3,0E-05	5,4E-02	0,00	-1786,72	C
HMOX1	D02	3,97	4,21	6,4E-02	5,4E-02	1,18	1,18	A
HPN	D03	5,80	4,21	1,8E-02	5,4E-02	0,33	-3,01	A
HYOU1	D04	3,58	4,21	8,3E-02	5,4E-02	1,54	1,54	A
ICAM1	D05	3,00	4,19	1,3E-01	5,5E-02	2,28	2,28	A
IGFALS	D06	12,72	4,21	1,5E-04	5,4E-02	0,00	-364,83	B
IL6ST	D07	2,25	1,01	2,1E-01	5,0E-01	0,42	-2,36	A
IPO4	D08	5,55	4,21	2,1E-02	5,4E-02	0,39	-2,53	A
FAM214A	D09	6,59	4,21	1,0E-02	5,4E-02	0,19	-5,20	A
KRT18	D10	-0,76	-0,07	1,7E+00	1,0E+00	1,61	1,61	A
KRT8	D11	2,93	4,21	1,3E-01	5,4E-02	2,42	2,42	A
L2HGDH	D12	9,74	4,21	1,2E-03	5,4E-02	0,02	-46,17	A
LGR5	E01	2,98	4,21	1,3E-01	5,4E-02	2,34	2,34	A
LPL	E02	14,83	4,21	3,4E-05	5,4E-02	0,00	-1580,06	B
LSS	E03	7,63	4,21	5,0E-03	5,4E-02	0,09	-10,74	A
MAOB	E04	5,99	4,21	1,6E-02	5,4E-02	0,29	-3,45	A
MAP3K6	E05	9,67	4,21	1,2E-03	5,4E-02	0,02	-44,25	A
MBL2	E06	9,52	4,21	1,4E-03	5,4E-02	0,03	-39,82	A
MCM10	E07	8,99	4,21	2,0E-03	5,4E-02	0,04	-27,61	A
MLXIPL	E08	8,18	4,21	3,5E-03	5,4E-02	0,06	-15,69	A
MRPS18B	E09	6,12	4,21	1,4E-02	5,4E-02	0,27	-3,77	A
NQO1	E10	0,95	0,20	5,2E-01	8,7E-01	0,59	-1,69	A
NUS1	E11	5,02	4,21	3,1E-02	5,4E-02	0,57	-1,75	A
OSMR	E12	2,54	2,55	1,7E-01	1,7E-01	1,01	1,01	A
SLC51A	F01	6,77	4,21	9,1E-03	5,4E-02	0,17	-5,92	A
PDYN	F02	15,01	4,21	3,0E-05	5,4E-02	0,00	-1786,72	C
PLA2G12A	F03	6,62	2,62	1,0E-02	1,6E-01	0,06	-16,01	A

PPARA	F04	5,91	4,21	1,7E-02	5,4E-02	0,31	-3,26	A
PSME3	F05	4,22	3,02	5,4E-02	1,2E-01	0,43	-2,30	A
PYGL	F06	3,47	4,21	9,0E-02	5,4E-02	1,67	1,67	A
RB1	F07	3,68	4,07	7,8E-02	6,0E-02	1,31	1,31	A
RDX	F08	3,15	3,56	1,1E-01	8,5E-02	1,32	1,32	A
RHBG	F09	8,57	4,21	2,6E-03	5,4E-02	0,05	-20,65	A
S100A8	F10	15,01	4,21	3,0E-05	5,4E-02	0,00	-1786,72	C
SCD	F11	-0,03	4,21	1,0E+00	5,4E-02	18,91	18,91	A
SERPINA3	F12	1,14	1,76	4,5E-01	3,0E-01	1,54	1,54	A
SERPINE1	G01	-2,01	4,21	4,0E+00	5,4E-02	74,38	74,38	A
SKIL	G02	5,67	4,21	2,0E-02	5,4E-02	0,36	-2,76	A
SLC17A3	G03	15,01	4,21	3,0E-05	5,4E-02	0,00	-1786,72	C
SLC2A3	G04	-1,43	1,94	2,7E+00	2,6E-01	10,34	10,34	A
SLC39A6	G05	4,85	4,08	3,5E-02	5,9E-02	0,59	-1,71	A
SREBF1	G06	6,01	4,21	1,6E-02	5,4E-02	0,29	-3,48	A
TAGLN	G07	3,62	3,25	8,1E-02	1,0E-01	0,78	-1,29	A
THRSP	G08	15,01	4,21	3,0E-05	5,4E-02	0,00	-1786,72	C
TMEM2	G09	2,20	4,21	2,2E-01	5,4E-02	4,01	4,01	A
TXNRD1	G10	0,30	4,21	8,1E-01	5,4E-02	15,01	15,01	A
WIPI1	G11	5,13	4,21	2,8E-02	5,4E-02	0,53	-1,90	A
YRDC	G12	4,78	4,21	3,6E-02	5,4E-02	0,67	-1,49	A
ACTB	H01	-1,18	-1,29	2,3E+00	2,4E+00	0,93	-1,08	OKAY
B2M	H02	1,43	1,68	3,7E-01	3,1E-01	1,19	1,19	A
GAPDH	H03	-1,99	-1,67	4,0E+00	3,2E+00	1,25	1,25	OKAY
HPRT1	H04	3,96	4,21	6,4E-02	5,4E-02	1,19	1,19	A
RPLP0	H05	-2,22	-2,93	4,7E+00	7,6E+00	0,61	-1,63	OKAY

Πίνακας 29: Συνολικά αποτελέσματα RT-qPCR για μείγμα 1^A

Symbol	Well	Fold Up-or Down Regulation		Fold Up-or Down Regulation	
		Test Group/Control Group	Test Group/Sample 2A	Test Group/Control Group	Test Group/Sample 1A
ABCB1	A01	1,34	1,34	3,71	3,71
ABCB11	A02	0,00	-894,36	0,00	-1786,72
ABCB4	A03	0,18	-5,45	0,06	-17,91
ABCC2	A04	1,58	1,58	2,32	2,32
ABCC3	A05	0,60	-1,66	0,42	-2,40

ALDOA	A06	1,27	1,27	4,31	4,31
APEX1	A07	0,86	-1,16	0,35	-2,85
ASAH1	A08	3,03	3,03	1,75	1,75
ATP8B1	A09	0,18	-5,62	0,07	-14,95
AVPR1A	A10	0,00	-894,36	0,00	-1334,85
BHMT	A11	0,10	-10,25	0,03	-38,94
BTG2	A12	0,05	-19,26	0,01	-79,31
CA3	B01	0,02	-58,87	0,01	-89,60
CASP3	B02	0,95	-1,05	0,48	-2,09
CCNG1	B03	2,46	2,46	1,43	1,43
CD36	B04	0,08	-12,15	0,05	-21,35
CD68	B05	0,08	-12,63	0,17	-5,85
CDC14B	B06	0,51	-1,98	0,40	-2,50
CDKN1A	B07	0,73	-1,36	1,98	1,98
COL4A1	B08	0,00	-894,36	0,00	-1786,72
CRYL1	B09	1,17	1,17	0,13	-7,51
CXCL12	B10	0,00	-894,36	0,00	-1786,72
CYP1A2	B11	0,00	-249,00	0,00	-268,12
DDIT4L	B12	0,00	-894,36	0,00	-275,65
DDX39A	C01	0,70	-1,43	1,46	1,46
DNAJB11	C02	2,28	2,28	2,29	2,29
DNAJC3	C03	0,59	-1,69	0,67	-1,48
FABP1	C04	0,84	-1,19	0,05	-19,16
FADS1	C05	1,65	1,65	0,31	-3,28
EMC9	C06	1,39	1,39	0,62	-1,61
FASN	C07	12,05	12,05	0,78	-1,29
FMO1	C08	0,00	-894,36	0,00	-1786,72
TIMM10B	C09	0,40	-2,53	0,08	-12,69
GADD45A	C10	0,63	-1,58	1,96	1,96
GCLC	C11	1,42	1,42	4,32	4,32
GSR	C12	0,79	-1,26	0,21	-4,72
HAO2	D01	0,00	-402,27	0,00	-1786,72
HMOX1	D02	1,20	1,20	1,18	1,18
HPN	D03	1,11	1,11	0,33	-3,01
HYOU1	D04	4,13	4,13	1,54	1,54
ICAM1	D05	4,74	4,74	2,28	2,28
IGFALS	D06	0,02	-53,68	0,00	-364,83
IL6ST	D07	0,51	-1,96	0,42	-2,36
IPO4	D08	0,93	-1,08	0,39	-2,53
FAM214A	D09	0,17	-6,05	0,19	-5,20
KRT18	D10	1,02	1,02	1,61	1,61
KRT8	D11	2,52	2,52	2,42	2,42
L2HGDH	D12	0,19	-5,21	0,02	-46,17

LGR5	E01	3,03	3,03	2,34	2,34
LPL	E02	0,00	-894,36	0,00	-1580,06
LSS	E03	1,96	1,96	0,09	-10,74
MAOB	E04	0,69	-1,46	0,29	-3,45
MAP3K6	E05	0,08	-12,71	0,02	-44,25
MBL2	E06	0,18	-5,50	0,03	-39,82
MCM10	E07	0,21	-4,81	0,04	-27,61
MLXIPL	E08	1,47	1,47	0,06	-15,69
MRPS18B	E09	0,53	-1,88	0,27	-3,77
NQO1	E10	1,57	1,57	0,59	-1,69
NUS1	E11	1,77	1,77	0,57	-1,75
OSMR	E12	0,47	-2,15	1,01	1,01
SLC51A	F01	0,15	-6,61	0,17	-5,92
PDYN	F02	0,00	-894,36	0,00	-1786,72
PLA2G12A	F03	0,25	-4,07	0,06	-16,01
PPARA	F04	1,06	1,06	0,31	-3,26
PSME3	F05	1,53	1,53	0,43	-2,30
PYGL	F06	2,16	2,16	1,67	1,67
RB1	F07	1,03	1,03	1,31	1,31
RDX	F08	1,09	1,09	1,32	1,32
RHBG	F09	1,08	1,08	0,05	-20,65
S100A8	F10	0,00	-894,36	0,00	-1786,72
SCD	F11	18,59	18,59	18,91	18,91
SERPINA3	F12	6,86	6,86	1,54	1,54
SERPINE1	G01	3,06	3,06	74,38	74,38
SKIL	G02	0,09	-11,50	0,36	-2,76
SLC17A3	G03	0,00	-521,95	0,00	-1786,72
SLC2A3	G04	0,39	-2,57	10,34	10,34
SLC39A6	G05	0,82	-1,23	0,59	-1,71
SREBF1	G06	0,36	-2,79	0,29	-3,48
TAGLN	G07	1,30	1,30	0,78	-1,29
THRSP	G08	0,00	-894,36	0,00	-1786,72
TMEM2	G09	2,62	2,62	4,01	4,01
TXNRD1	G10	4,01	4,01	15,01	15,01
WIP1	G11	1,23	1,23	0,53	-1,90
YRDC	G12	0,92	-1,09	0,67	-1,49
ACTB	H01	2,23	2,23	0,93	-1,08
B2M	H02	1,57	1,57	1,19	1,19
GAPDH	H03	0,47	-2,13	1,25	1,25
HPRT1	H04	1,04	1,04	1,19	1,19
RPLP0	H05	0,58	-1,72	0,61	-1,63

Πίνακας 30: Συνολικά αποτελέσματα RT-qPCR συγκριτικά.

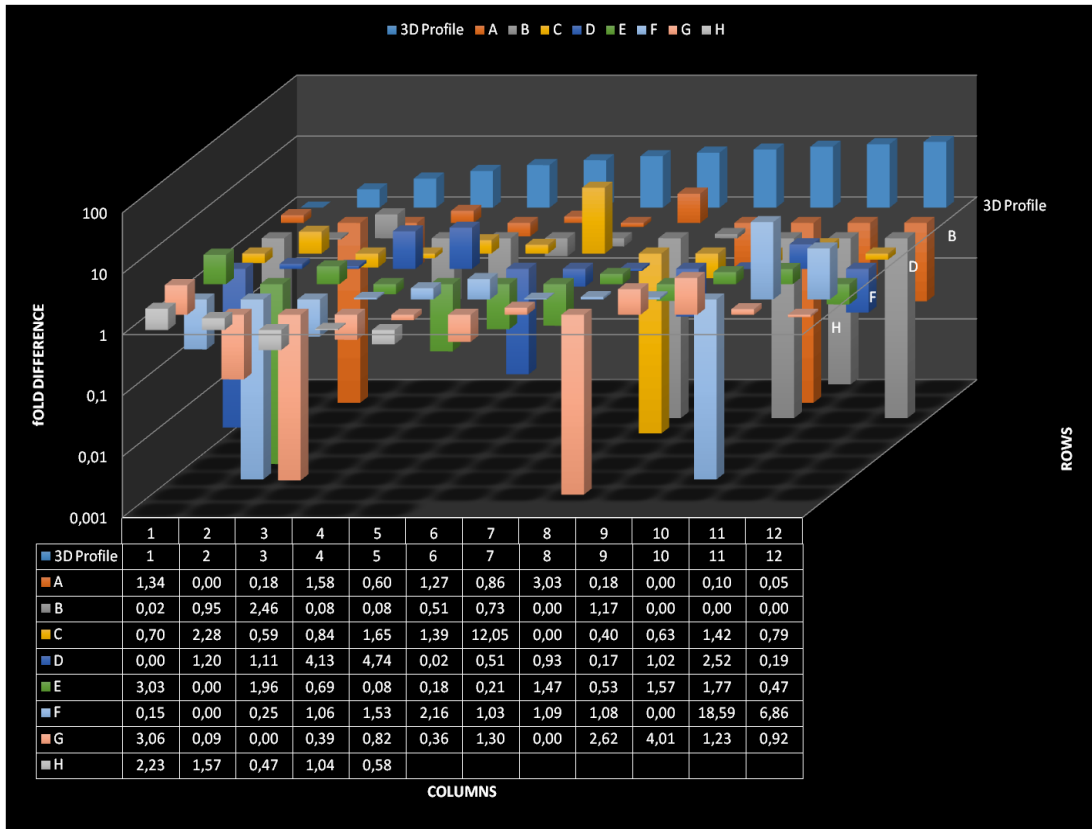
*Η αποτύπωση της γονιδιακής ρύθμισης με τρόπο πολλαπλάσιας μεταβολής (**Fold-Regulation**) αντιπροσωπεύει τα αποτελέσματα της μεταβολής της έκφρασης με βιολογικά ουσιαστικό τρόπο. Οι τιμές μεταβολής (+), μεγαλύτερες από μία μονάδα υποδηλώνουν θετική ή ανοδική ρύθμιση. Οι τιμές μεταβολής (-), μικρότερες από μία μονάδα υποδεικνύουν αρνητική ή προς τα κάτω ρύθμιση. Οι τιμές μεγαλύτερες από 2 μονάδες υποδεικνύονται με **κόκκινο χρώμα** και οι τιμές μικρότερες από 0,5 , αλλά και μικρότερες από -2, υποδεικνύονται με **μπλε χρώμα**. Τα εμπλεκόμενα γονίδια δείχνουν συνεπώς τη μεγαλύτερη μεταβολή γονιδιακής έκφρασης από την επίδραση των υπό μελέτη συστατικών.

****Σχόλια:**

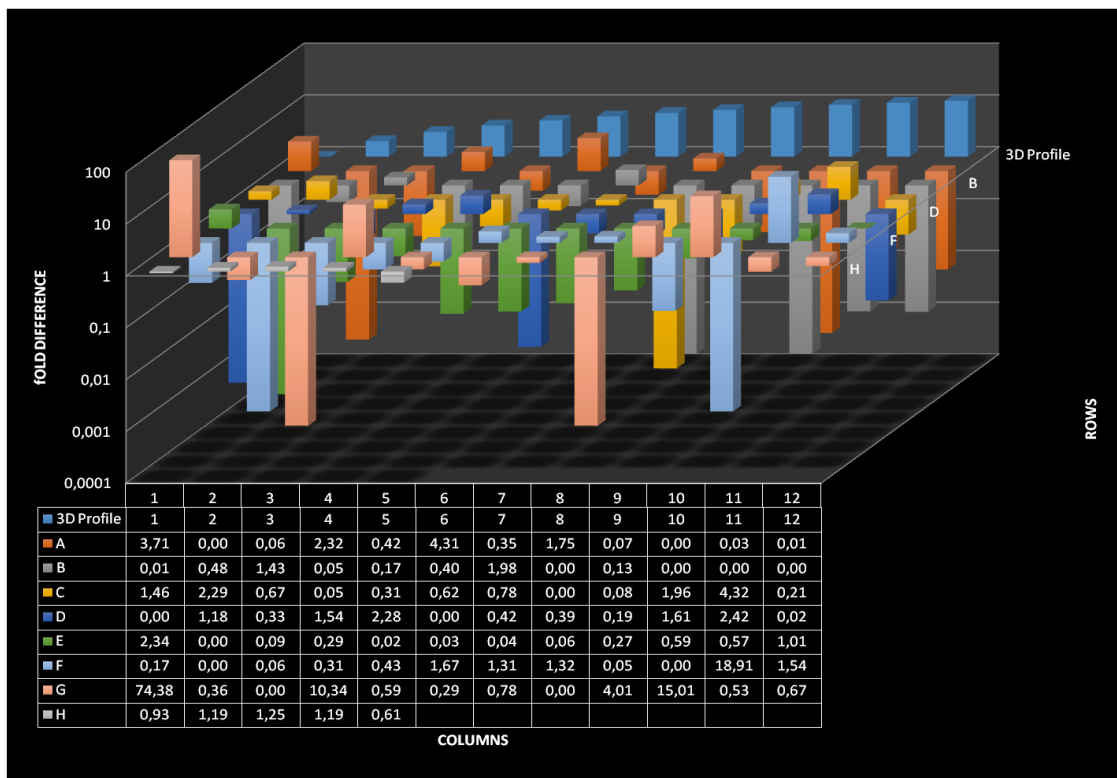
A: ο μέσος κύκλος κατωφλίου αυτού του γονιδίου είναι σχετικά υψηλός (> 30) στον μάρτυρα και είναι χαμηλός στο δείγμα (< 30). Αυτά τα δεδομένα σημαίνουν ότι η έκφραση του γονιδίου είναι σχετικά χαμηλή σε ένα δείγμα και εύλογα ανιχνεύεται στο άλλο δείγμα.

B: ο μέσος κύκλος κατωφλίου αυτού του γονιδίου είναι σχετικά υψηλός (> 30), πράγμα που σημαίνει ότι το σχετικό επίπεδο έκφρασής του είναι χαμηλό, τόσο στα δείγματα ελέγχου όσο και στα δείγματα δοκιμής. Επομένως, είναι σημαντικό να υπάρχει επαρκής αριθμός βιολογικών αντιγράφων για την επικύρωση του αποτελέσματος για αυτό το γονίδιο.

C: ο μέσος κύκλος κατωφλίου αυτού του γονιδίου είτε δεν προσδιορίζεται είτε είναι μεγαλύτερος από την καθορισμένη αποκοπή (default 35), και στα δύο δείγματα που σημαίνει ότι η έκφρασή του δεν εντοπίστηκε, καθιστώντας αυτό το αποτέλεσμα αλλαγής αναδίπλωσης λανθασμένο και μη ερμηνεύσιμο.

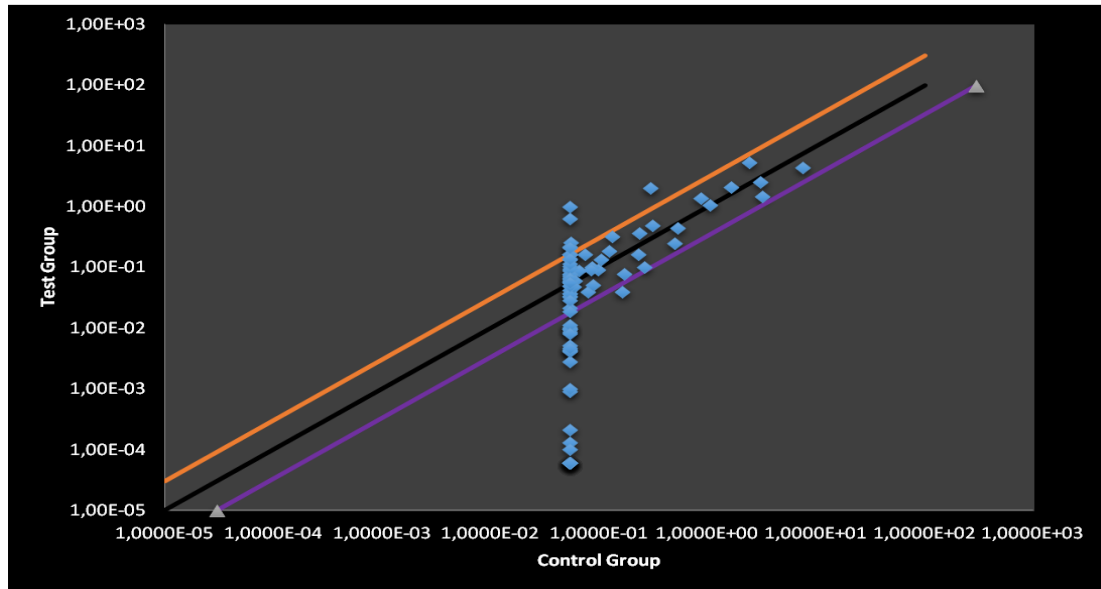


Σχήμα 45: 3D Διάγραμμα αυξομείωσης γονιδιακής έκφρασης δείγμα 2^A

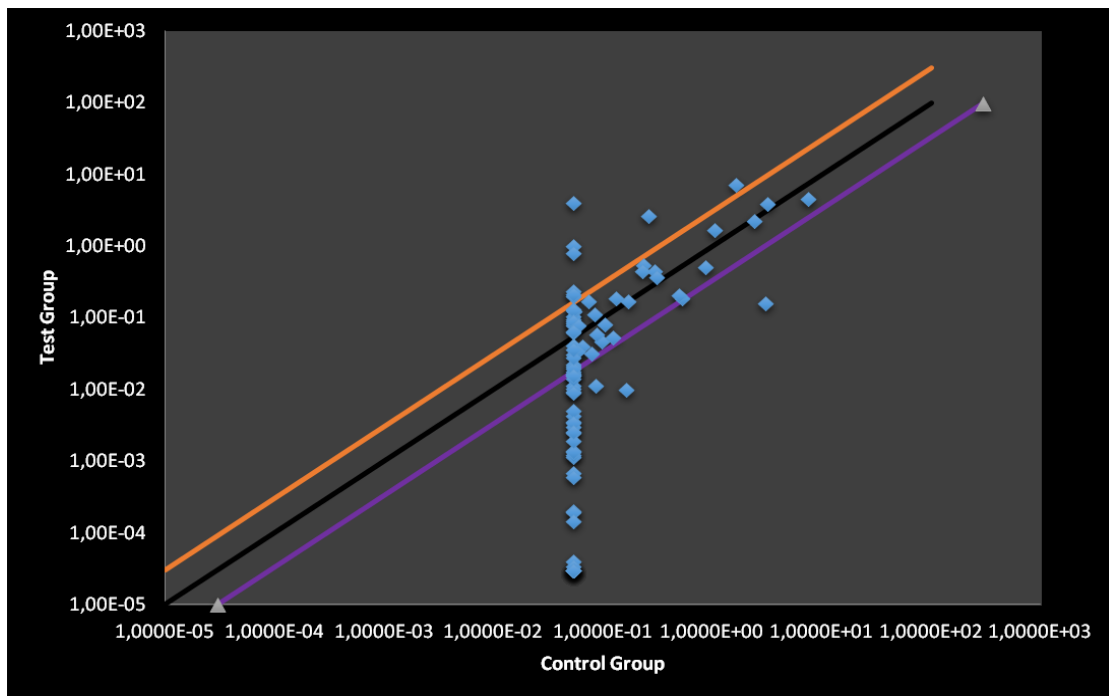


Σχήμα 46: 3D Διάγραμμα αυξομείωσης γονιδιακής έκφρασης δείγμα 1A

*Όπου Α φαίνονται οι διακυμάνσεις (είτε αύξηση είτε μείωση της δράσης) των δράσεων των γονιδίων που βρίσκονται στις θέσεις της πρώτης γραμμής στην πλάκα που χρησιμοποιήσαμε για τον προσδιορισμό. Στην θέση Β φαίνονται οι δράσεις των γονιδίων της δεύτερης γραμμής της πλάκας και ούτο καθεξίς και για τα υπόλοιπα γράμματα του διαγράμματος.



Σχήμα 47: Scatter plot δείγμα 2Α



Σχήμα 48: Scatter plot δείγμα 1Α

*Η μαύρη γραμμή στο διάγραμμα υποδεικνύει αλλαγές γονιδιακής έκφρασης ($(2^{-\Delta Ct})$) του 1. Η πορτοκαλί και μωβ γραμμές υποδεικνύουν την επιθυμητή μεταβολή στο κατώφλι έκφρασης γονιδίων, που ορίζεται από τον χρήστη.

ΔΕΙΓΜΑ 2Α

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει μια εύκολη έκφραση όλων των εξεταζόμενων γονιδίων, καθώς το $Ct_{sample} < Ct_{control}$ με το Fold Up- or Down-Regulation να υποδηλώνει το μέγεθος της αλλαγής αυτής. Όσον αφορά το **δείγμα 2Α**, ανέκφραστα παραμένουν τα γονίδια **ABCB11 (A02) & S100A8 (F10)** τα οποία αναγνωρίζονται για τη δραστηριότητά τους. Το πρώτο καταλύει τη μεταφορά μεγάλων υδρόφοβων χολικών αλάτων με τρόπο εξαρτώμενο από ATP, συμμετέχοντας έτσι στην ομοιοστάση του ηπατικού χολικού οξέος και στη συνέχεια στην ομοιοστάση των λιπιδίων, και το δεύτερο ως πρωτεΐνη δέσμευσης ασβεστίου και ψευδαργύρου παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των φλεγμονωδών διεργασιών και της ανοσοαπόκρισης.

Έπειτα από σύγκριση του δείγματος με το control παρατηρείται η έκφραση κάποιων επιπλέον γονιδίων τα οποία δεν εκφράζονταν στο control δειγμα τα οποία είναι τα εξής: **AVPRIA(A10), BHMT(A11), BTG2(A12), CA3(B01), CD68(B05), COL4A1(B08), CYP1A2(B11), DDIT4L(B12), DDX39A(C01), FM01(C08), TIMM10B(C09), HMOX1(D02), HYOU1(D04), FAM214A(D09), L2HGPH(D12), LGR5(E01), LPL(E02), LSS(E03), MAOB(E04), MCM10(E07), NQO1(E10), SLC51A(F01), PDYN(F02), SCD(F11), SERPINE1(G01), SKIL(G02), SLC17A3(G03), THRSP(G08), YRDC(G12).**

Με υπερβολικά μειωμένη έκφραση (**Fold Down-Regulation > -25 και τιμές έως -894,36**) να παρουσιάζονται στα (Gene Database, 2023) με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν τα εξής γονίδια:

- **AVPRIA (A10):** Αποτελεί τον δεύτερο αγγελιοφόρο φωσφατιδυλινοσιτόλης-ασβεστίου (Ο υποδοχέας μεσολαβεί στη συστολή και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, στη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων, στην απελευθέρωση του παράγοντα πήξης και στη γλυκογονόλυση)
- **BTG2 (A12):** Πρωτεΐνη που φαίνεται να έχει αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητες. Ενεργοποιεί τη αποαδενυλίωση του mRNA με τρόπο

εξαρτώμενο από CNOT6 και CNOT7. Συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, ενώ θα μπορούσε να εμπλακεί στη διακοπή της ανάπτυξης και στη διαφοροποίηση των νευρωνικών προδρόμων κυττάρων.

- **CA3 (B01):** Κατηγορία μεταλλοενζύμων που καταλύουν την αναστρέψιμη ενυδάτωση του διοξειδίου του άνθρακα και εκφράζονται διαφορικά σε έναν αριθμό κυτταρικών τύπων.
- **COL4A1 (B08):** Λειτουργεί ως μέρος ενός ετεροτριμερούς και αλληλοεπιδρά με άλλα συστατικά εξωκυτταρικής μήτρας, όπως περλεκάνη, πρωτεογλυκάνες και λαμινίνες. Επιπλέον, η πρωτεολυτική διάσπαση του καρβοξυ-τελικού άκρου έχει ως αποτέλεσμα ένα βιολογικά ενεργό θραύσμα γνωστό ως arresten, το οποίο έχει αντι-αγγειογόνες και κατασταλτικές ιδιότητες όγκου.
- **CXCL12 (B10):** Παίζει ρόλο σε πολλές διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως εμβρυογένεση, ανοσολογική παρακολούθηση, απόκριση φλεγμονής, ομοιόσταση ιστού και ανάπτυξη όγκου και μετάστασης.
- **CYP1A2 (B11):** Αποτελεί μια μονοοξυγενάση κυτοχρώματος P450 που εμπλέκεται στο μεταβολισμό διαφόρων ενδογενών υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων λιπαρών οξέων, στεροειδών ορμονών και βιταμινών. Παίζει ρόλο στον οξειδωτικό μεταβολισμό των ξενοβιοτικών συστατικών ενώ μπορεί να λειτουργήσει ως κύριο ένζυμο για βιοσύνθεση all-trans ρετινοϊκού οξέος στο ήπαρ.
- **DDIT4L (B12):** Προβλέπεται να εμπλέκεται στην αρνητική ρύθμιση της μεταγωγής σήματος. Αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη ρυθμίζοντας την οδό σηματοδότησης TOR προς τον σχηματισμό του συμπλόκου TSC1-TSC2 έναντι του AKT1.
- **FMO1 (C08):** Το FMO1 (φλαβίνη που περιέχει Μονοοξυγενάση Διμεθυλανιλίνης 1) είναι ένα γονίδιο κωδικοποίησης πρωτεΐνης. Μεταξύ των σχετικών οδών της είναι η φάση βιομετασχηματισμού Metapathway I και II και η οδός Busulfan, στη φαρμακοδυναμική. Αυτή η πρωτεΐνη εμπλέκεται στον οξειδωτικό μεταβολισμό μιας ποικιλίας ξενοβιοτικών όπως φάρμακα και φυτοφάρμακα. Η μορφή I καταλύει την-οξυγόνωση

δευτεροταγών και τριτοταγών αμινών.

- **HAO2 (D01):** Αποτελεί μια οξειδάση που καταλύει την οξείδωση υδροξυοξέων μέσης και μακράς αλυσίδας όπως το 2-υδροξυεξαδεκανοϊκό και το 2-υδροξυοκτανοϊκό, στα αντίστοιχα 2-οξοξέα.
- **IGFALS (D06):** Δεσμεύει αυξητικούς παράγοντες που μοιάζουν με ινσουλίνη, αυξάνοντας τον χρόνο ημιζωής τους και τον αγγειακό εντοπισμό τους.
- **LPL (E02):** Βασικό ένζυμο στο μεταβολισμό των τριγλυκεριδίων. Καταλύει την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων από κυκλοφορούντα χυλομικράνια και λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL) και έτσι παίζει σημαντικό ρόλο στην κάθαρση λιπιδίων από τη ροή του αίματος, τη χρήση λιπιδίων και την αποθήκευση. Μεσολαβεί στην περιθωριοποίηση σωματιδίων λιποπρωτεϊνών πλούσιων σε τριγλυκερίδια σε τριχοειδή αγγεία.
- **PDYN (F02):** Παίζει ρόλο σε μια σειρά φυσιολογικών λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένης της αντίληψης του πόνου και των απαντήσεων στο άγχος, έχει τυπική δραστηριότητα οπιοειδών και μπορεί να έχει αντι-αποπρωτική δράση (οι Leu-εγκεφαλίνες ανταγωνίζονται και μιμούνται τις επιδράσεις των οπιούχων φαρμάκων).
- **SCD (F11):** Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί ένα ένζυμο που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων, κυρίως στη σύνθεση του ελαϊκού οξέος. Παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στη λιπογένεση και στη ρύθμιση της οξείδωσης των μιτοχονδριακών λιπαρών οξέων. Παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιοστάση της ενέργειας του σώματος. Συμβάλλει στη βιοσύνθεση φωσφολιπιδίων μεμβράνης, εστέρων χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων
- **SLC17A3 (G03):** Συμμετέχει στην έκκριση ουρικού από το κύτταρο στον αυλό, το οποίο είναι το τελικό προϊόν του μεταβολισμού πουρίνης.
- **THRSP (G08):** Παίζει ρόλο στη ρύθμιση της λιπογένεσης, ειδικά στον Θηλάζοντα μαστικό αδένα. Σημαντικό για τη βιοσύνθεση τριγλυκεριδίων με αλυσίδες λιπαρών οξέων μεσαίου μήκους. Βρίσκεται επίσης να εκφράζεται σε λιπογενείς καρκίνους του μαστού, γεγονός που υποδηλώνει ένα ρόλο στον έλεγχο του μεταβολισμού των λιπιδίων του

όγκου

Παράλληλα τα γονίδια στα οποία παρατηρείται **υπερέκφραση (Fold Up-Regulation με Ct_{sample} << Ct_{control})** των προϋπάρχοντων εκφραζόμενων γονιδίων με βάση (Gene Database, 2023) είναι τα εξής:

- **FASN (C07):** Το ένζυμο που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη. Η κύρια λειτουργία του είναι να καταλύει τη σύνθεση παλμιτικού από ακετυλο-CoA και μηλονυλο-CoA, παρουσία NADPH, σε κορεσμένα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας. Μεταξύ των σχετικών οδών του είναι ο μεταβολισμός των στεροειδών και ο μεταβολισμός των υδατοδιαλυτών βιταμινών και συμπαραγόντων.
- **SERPINA3 (F12):** Το SERPINA3 (Serpin Family a Member 3) είναι ένα γονίδιο κωδικοποίησης πρωτεΐνης. Αυτό το γονίδιο είναι ένα σε ένα σύμπλεγμα γονιδίων σερπίνης που βρίσκεται στον βραχίονα q του χρωμοσώματος 14. Οι πολυμορφισμοί σε αυτή την πρωτεΐνη φαίνεται να είναι ειδικοί για τον ιστό και επηρεάζουν τη στόχευση πρωτεάσης. Παραλλαγές στην αλληλουχία αυτής της πρωτεΐνης έχουν εμπλακεί στη νόσο του Αλτσχάιμερ και η ανεπάρκεια αυτής της πρωτεΐνης έχει συσχετιστεί με ηπατική νόσο. Μεταλλάξεις έχουν εντοπιστεί σε ασθενείς με νόσο του Πάρκινσον και χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια.
- **SCD (F11):** Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί ένα ένζυμο που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων, κυρίως στη σύνθεση του ελαϊκού οξέος. Η πρωτεΐνη ανήκει στην οικογένεια δεσατουράσης λιπαρών οξέων και είναι μια ολοκληρωμένη πρωτεΐνη μεμβράνης που βρίσκεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Μεταξύ των σχετικών οδών του είναι ο μεταβολισμός των στεροειδών και η σηματοδότηση με μεσολάβηση NR1H2 και NR1H3. Παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στη λιπογένεση και στη ρύθμιση της οξειδωσης των μιτοχονδριακών λιπαρών οξέων. Παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση της ενέργειας του σώματος. Συμβάλλει στη βιοσύνθεση φωσφολιπιδίων μεμβράνης, εστέρων χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων.

ΔΕΙΓΜΑ 1Α

Όσον αφορά το δείγμα 1Α ανέκφραστα παραμένουν τα γονίδια **ABCB11 (A02) & S100A8 (F10)** όπως και στο δείγμα 2Α αλλά και το γονίδιο **SLC17A3(G03)**. Οι δράσεις των 2 πρώτων αναφέρθηκαν παραπάνω ενώ το τελευταίο είναι ένα γονίδιο κωδικοποίησης πρωτεΐνης. Το **SLC17A3** συμμετέχει στην έκκριση ουρικού από το κύτταρο στον αυλό, το οποίο είναι το τελικό προϊόν του μεταβολισμού πουρίνης.

Έπειτα από σύγκριση του δείγματος με το control παρατηρείται η έκφραση κάποιων επιπλέον γονιδίων τα οποία δεν εκφράζονταν στο control δείγμα τα οποία είναι τα εξής: **AVPRIA(A10), BHMT(A11), BTG2(A12), CA3(B01), CD68(B05), COL4A1(B08), CYP1A2(B11), DDIT4L(B12), DDX39A(C01), FM01(C08), TIMM10B(C09), HMOX1(D02), HYOU1(D04), FAM214A(D09), L2HGPH(D12), LGR5(E01), LPL(E02), LSS(E03), MAOB(E04), MCM10(E07), NQO1(E10), SLC51A(F01), PDYN(F02), SCD(F11), SERPINE1(G01), SKIL(G02), THRSP(G08), YRDC(G12)**.

Με υπερβολικά μειωμένη έκφραση (**Fold Down-Regulation > -25 και τιμές έως -1786,72**) να παρουσιάζονται στα (Gene Database, 2023) με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν τα εξής γονίδια:

- **AVRIA (A10):** Με δράση που αναφέρθηκε παραπάνω
- **BHMT (A11):** Συμμετέχει στη ρύθμιση του μεταβολισμού της ομοκυστεΐνης. Αυτή η αντίδραση απαιτείται επίσης για την μη αναστρέψιμη οξείδωση της χολίνης.
- **BTG2 (A12) :**Με δράση που αναφέρθηκε παραπάνω
- **CA3 (B01) :**Με δράση που αναφέρθηκε παραπάνω
- **COL4A1 (B08) :**Με δράση που αναφέρθηκε παραπάνω
- **CXCL12 (B10) :**Με δράση που αναφέρθηκε παραπάνω
- **CYP1A2 (B11) :**Με δράση που αναφέρθηκε παραπάνω
- **DDIT4L (B12) :**Με δράση που αναφέρθηκε παραπάνω
- **FM01 (C08) :**Με δράση που αναφέρθηκε παραπάνω
- **HAO2 (D01) :**Με δράση που αναφέρθηκε παραπάνω
- **IGFALS (D06) :**Με δράση που αναφέρθηκε παραπάνω
- **L2HGDH (D12):** Είναι ένα γονίδιο κωδικοποίησης πρωτεΐνης. Μεταξύ

των σχετικών οδών του είναι ο μεταβολισμός του πυροσταφυλικού και η αναπνευστική μεταφορά ηλεκτρονίων, η σύνθεση ATP με χημειοσμωτική σύζευξη και η παραγωγή θερμότητας με αποσύνδεση πρωτεϊνών.

- **LPL (E02)** :Με δράση που αναφέρθηκε παραπάνω
- **MAP3K6 (E05)**: Είναι ένα γονίδιο κωδικοποίησης πρωτεΐνης. Οι ασθένειες που σχετίζονται με το MAP3K6 περιλαμβάνουν το σύνδρομο διάχυτου γαστρικού και λοβιακού καρκίνου του μαστού και τον διάχυτο γαστρικό καρκίνο. Μεταξύ των σχετικών οδών είναι η σηματοδότηση TCR και η ρυθμιστική Οδός πρωτεΐνης δ που μοιάζει με Αγγειοποιητίνη.
- **MBL2 (E06)**: Δεσμεύει μαννόζη, φουκόζη και N-ακετυλογλυκοζαμίνη σε διαφορετικούς μικροοργανισμούς και ενεργοποιεί την οδό συμπληρώματος λεκτίνης. Συνδέεται με όψιμα αποπτωτικά κύτταρα, καθώς και με αποπτωτικά βλέννες και με νεκρωτικά κύτταρα, αλλά όχι με πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα, διευκολύνοντας την πρόσληψή τους από μακροφάγα. Μετά τη μόλυνση SARS coronavirus-2 / SARS-CoV- 2, ενεργοποιεί την οδό λεκτίνης συμπληρώματος που οδηγεί στην αναστολή της λοίμωξης SARS-CoV-2 και στη μείωση της επαγόμενης φλεγμονώδους απόκρισης.
- **MCM10 (E07)**: Δρα ως παράγοντας έναρξης αντιγραφής που συγκεντρώνει την ελικάση MCM2-7 και το σύμπλοκο DNA πολυμεράσης άλφα/πριμάσης προκειμένου να ξεκινήσει η αντιγραφή του DNA. Επιπλέον, παίζει ρόλο στην πρόληψη βλάβης του DNA κατά την αντιγραφή.
- **PDYN (F02)** :Με δράση που αναφέρθηκε παραπάνω
- **SLC17A3 (G03)**: Είναι ένα γονίδιο κωδικοποίησης πρωτεϊνών. Οι ασθένειες που σχετίζονται με το SLC17A3 περιλαμβάνουν συγκέντρωση ουρικού οξέος, ορό, ποσοτικό σημείο χαρακτηριστικών 4 και νεφρολιθίαση, ουρικό οξύ. Μεταξύ των σχετικών οδών του είναι η μεταφορά διαύλων ιόντων και η μεταφορά ανόργανων κατιόντων / ανιόντων και αμινοξέων / ολιγοπεπτιδίων
- **THRSP (G08)** :Με δράση που αναφέρθηκε παραπάνω

Παράλληλα τα γονίδια στα οποία παρατηρείται **υπερέκφραση (Fold Up-Regulation με Ctsample << Ctcontrol)** των προυπάρχοντων εκφραζόμενων γονιδίων

με βάση (Gene Database, 2023) είναι τα εξής:

- **SCD (F11):** Με δράση που αναφέρθηκε παραπάνω
- **SEPRINE1 (G01):** Είναι ένας πρωταρχικός αναστολέας του ενεργοποιητή πλασμινογόνου τύπου ιστού (PLAT) και του ενεργοποιητή πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης (PLAU). Ως αναστολέας PLAT, απαιτείται για ρύθμιση της ινωδολύσης και είναι υπεύθυνη για την ελεγχόμενη αποικοδόμηση θρόμβων αίματος. Ενεργεί ως ρυθμιστής της μετανάστευσης κυττάρων, ανεξάρτητα από το ρόλο του ως ανασταλτικού παράγοντα πρωτεασών. Συμμετέχει στη ρύθμιση της διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων του περιοδοντικού συνδέσμου και ρυθμίζει τη διαφοροποίηση των οδοντοβλαστών και τον σχηματισμό οδοντίνης κατά τη διάρκεια της οδοντογένεσης.
- **SLC2A3 (G04):** Είναι ένα γονίδιο κωδικοποίησης πρωτεΐνης. Οι ασθένειες που σχετίζονται με το SLC2A3 περιλαμβάνουν τη νόσο του Huntington και το Acanthosis Nigricans. Μεταξύ των σχετικών οδών είναι η γονιδιακή έκφραση (μεταγραφή) και το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα. Οι σχολιασμοί οντολογίας γονιδίων (GO) που σχετίζονται με αυτό το γονίδιο περιλαμβάνουν τη δραστηριότητα διαμεμβρανικού μεταφορέα και τη δραστηριότητα διαμεμβρανικού μεταφορέα γλυκόζης.
- **TXNRD1 (G10):** Είναι ένα γονίδιο κωδικοποίησης πρωτεΐνης. Μεταξύ των σχετικών οδών της είναι τα πυρηνικά γεγονότα που διαμεσολαβούνται από το NFE2L2 και την γονιδιακή έκφραση (μεταγραφή).

SYMBOL	WELL	CONTROL	NATURAL EXTRACTS CREAM (ΜΕΙΓΜΑ 2Α)	NATURAL EXTRACTS CHOLOLAT (ΜΕΙΓΜΑ 1Α)	MUTATION RELATED TO:	ACTION OF PROTEIN CODING GENE	RELATED PATHWAYS
ABCB1	A01	36,33	24,77	22,306	Inflammatory Bowel Disease 13 and Colchicine Resistance .	Multidrug resistance.	Imipramine/Desipramine Pathway , Pharmacokinetics and Drug ADME .
ABCB11	A02	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Cholestasis , Progressive Familial Intrahepatic, 2 and Cholestasis, Benign Recurrent Intrahepatic, 2 .	Multidrug resistance (major canalicular bile salt export pump)	Synthesis of bile acids and bile salts and Statin Pathway-Generalized , Pharmacokinetics .
ABCB4	A03	35,789	27,641	28,359	Undetermined	Transport of phospholipids from liver hepatocytes into bile.	Regulation of activated PAK-2p34 by proteasome mediated degradation and PPARA activates gene expression .
ABCC2	A04	32,882	22,416	20,867	Dubin-Johnson Syndrome and Pseudoxanthoma Elasticum .	Canalicular Multidrug Resistance Protein	Drug ADME and Statin Pathway-Generalized , Pharmacokinetics .
ABCC3	A05	36,998	25,926	25,462	Dubin-Johnson Syndrome and Cholest	Canicular Multispecific	g ADME and Paracetamol ADME .

					asis.	Organic Anion Transporter	
ALDOA	A06	30,07	19,923	17,158	Glycogen Storage Disease Xii and Hemolytic Anemia.	Epididymis Secretory Sperm Binding Protein Li61p	glycolysis (BioCyc) and Responseto elevated platelet cytosolic Ca2+
APEX1	A07	31,705	22,117	22,412	Xeroderma Pigmentosum, Variant Type and Cheilitis.	Multifunctional DNA Repair Enzyme	use excision repair and PackagingOf Telomere Ends
ASAH1	A08	35,148	23,597	23,392	Farber Lipogranulomatosis and Spinal Muscular Atrophy With Progressive Myoclonic Epilepsy.	Acid Ceramidase	Innate Immune System and Sphingolipid metabolism
ATP8B1	A09	Undetermined	27,685	28,099	Cholestasis, Progressive Familial Intrahepatic, 1 and Cholestasis, Benign Recurrent Intrahepatic, 1.	Probable Phospholipid-Transporting ATPase	n channel transport and Synthesisof bile acids and bile salts.
AVPR1A	A10	Undetermined	39,236	34,579	musia and Hepatorenal Syndrome	Antidiuretic Hormone Receptor 1A	Class A/1 (Rhodopsin-like receptors) and GPCR downstreamsignalling.
BHMT	A11	Undetermined	28,552	29,48	Hyperhomocysteinemia and Neural Tube Defects.	Epididymis Secretory Sperm Binding Protein Li61p	superpathway of choline degradation to L-serine and One-carbon metabolism and related pathways.
BTG2	A12	Undetermined	29,463	30,506	Diffuse Large B-Cell Lymphoma Activated B-Cell Type and Medulloblastoma.	Nerve Growth Factor- Inducible Anti-Proliferative	Gene expression (Transcription) and TP53 RegulatesTranscription of Cell Cycle Genes.
CA3	B01	Undetermined	31,074	30,682	Acute Myocardial Infarction and Neuromuscular Disease.	Epididymis Secretory Sperm Binding Protein Li 167mP (tissue specific: high levels in skeletal muscle and lower levels in cardiac and smooth muscle.)	Metabolism and Reversiblehydration of carbon dioxide.
CASP3	B02	34,145	24,415	24,405	Ischemia and Spinal Cord Injury.	Apoptosis-Related Cysteine Peptidase	TNFR1 Pathway and Apoptosis and survival FAS signaling cascades.
CCNG1	B03	33,7	22,594	22,381	Mantle Cell Lymphoma and Retinoblastoma.	lin-dependent protein kinases	Gene expression (Transcription) and Regulation of TP53 Expression and Degradation.
CD36	B04	35,634	28,798	28,612	Platelet Glycoprotein Iv Deficiency and Coronary Heart Disease 7.	fourth major glycoproteinof the platelet surface-receptor for thrombospondin	MyD88 dependent cascade initiated on endosome and Diseases of Immune System.
CD68	B05	Undetermined	28,854	26,745	Granular Cell Tumor and Histiocytic Sarcoma.	Scavenger Receptor-monocytes and tissue macrophages	Innate Immune System and Macrophage markers.
CDC14B	B06	34,454	25,634	24,976	Adrenal Gland Pheochromocytoma.	Dual Specificity ProteinPhosphatase-exit of cellmitosis and initiation of DNA replication	RAF/MAP kinase cascade and Regulation of activated PAK-2p34 by proteasome mediateddegradation.
CDKN1A	B07	32,92	23,564	21,133	Multiple Endocrine Neoplasia, Type 1 and TongueCarcinoma.	CDK-Interacting Protein 1	Regulation of activated PAK-2p34 by proteasome mediated degradation and Aberrant regulation of mitotic G1/S transition in cancerdue to RB1 defects.
COL4A1	B08	Undetermined	37,584	37,014	Retinal Arteries, Tortuosity Of and Angiopathy, Hereditary, With Nephropathy, Aneurysms, And Muscle Cramps.	Collagen Alpha-1(IV) Chain protein-integral components of basement membranes	Collagen chain trimerization and Integrin Pathway.
CRYL1	B09	34,315	24,281	26,421	Pentosuria and Deafne ss, Autosomal Recessive 1A.	Testicular Tissue Protein Li 44-alternative glucose metabolic pathway	Formation of xylulose-5- phosphate and Glycosaminoglycanmetabolism.
CXCL12	B10	36,319	35,361	38,124	Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Ischemia.	Stromal Cell-Derived Factor 1	Apoptotic Pathways in Synovial Fibroblasts and MIF Mediated Glucocorticoid Regulation.
CYP1A2	B11	Undetermined	33,155	32,263	Porphyria Cutanea Tarda and Acetaminophen Metabolism.	Cytochrome P450 4 superfamily of enzymes	Imipramine/Desipramine Pathway, Pharmacokinetics and Metapathway biotransformation Phase I and II.
DDIT4L	B12	Undetermined	37,705	32,303	Brain Germinoma and Lung Pleomorphic Carcinoma.	DNA-Damage-InducibleTranscript 4	MTOR signalling.
DDX39A	C01	Undetermined	25,709	23,65	Hairy Tongue	Nuclear RNA Helicase	Gene expression (Transcription) and Transport of Mature Transcript to Cytoplasm.

DNAJB11	C02	34,549	23,558	22,55	Polycystic Kidney Disease 6 With Or Without Polycystic Liver Disease and Cystic Kidney Disease .	Human DnaJ Protein 9- co-chaperone of binding immunoglobulin protein	Unfolded Protein Response (UPR) and Cellular responses to stimuli .
DNAJC3	C03	34,286	25,236	24,051	Ataxia, Combined Cerebellar And Peripheral, With Hearing Loss And Diabetes Mellitus and Influenza .	Double-Stranded RNA- Activated Protein Kinase Inhibitor	Unfolded Protein Response (UPR) and Innate Immune System .
FABP1	C04	29,164	19,615	22,622	Hepatocellular Adenoma and Liver Benign Neoplasm .	Liver-Type Fatty Acid-Binding Protein	Cellular responses to stimuli and Triglyceride metabolism .
FADS1	C05	35,362	24,469	25,908	Lipid Metabolism Disorder and Hypobetalipoproteinemia, Familial, 1 .	Regulate unsaturation of fatty acids	docosahexaenoate biosynthesis IV (4-desaturase, mammals) and Fatty acid metabolism .
EMC9	C06	34,733	24,452	24,616	Intraocular Retinoblastoma .	ER Membrane Protein Complex Subunit 9	Undetermined-Contributes to membrane insertase activity.
FASN	C07	38,668	21,604	24,561	Alcoholic Fatty Liver Disease and Fatty Liver Disease .	Catalyze the synthesis of palmitate from acetyl-CoA and malonyl-CoA	Metabolism of steroids and Metabolism of water-soluble vitamins and cofactors .
FMO1	C08	Undetermined	38,551	37,345	Trimethylaminuria and Thyroid Dyshormonogenesis 6 .	catalyzes the oxidation of soft nucleophilic heteroatom centers in drugs, pesticides, and xenobiotics.	Metapathway biotransformation Phase I and II and Busulfan Pathway, Pharmacodynamics .
TIMM10B	C09	Undetermined	26,533	27,862	Mohr-Tranebjaerg Syndrome and Sengers Syndrome .	Translocase Of Inner Mitochondrial Membrane 10 Homolog B	Peroxisomal lipid metabolism .
GADD45A	C10	37,758	25,856	23,225	Ataxia-Telangiectasia and Colorectal Cancer .	Responds to environmental stresses	Endometrial cancer and Gene expression (Transcription) .
GCLC	C11	35,328	24,692	22,086	Gamma-Glutamylcysteine Synthetase Deficiency, Hemolytic Anemia Due To and Glutamate-Cysteine Ligase Deficiency .	Gamma-Glutamylcysteine Synthetase	Glutathione conjugation and Nuclear events mediated by NFE2L2 .
GSR	C12	35,521	25,526	26,435	Hemolytic Anemia Due To Glutathione Reductase Deficiency and Riboflavin Deficiency .	Reduces oxidized glutathione disulfide (GSSG) to the sulfhydryl form GSH, (cellular antioxidant).	Nuclear events mediated by NFE2L2 and Glutathione conjugation .
HAO2	D01	39,225	33,847	35,424	Histidinemia and Histidine Metabolism Disease .	Long Chain Alpha-Hydroxy Acid Oxidase	Peroxisomal lipid metabolism and Metabolism .
HMOX1	D02	Undetermined	24,928	23,957	Heme Oxygenase 1 Deficiency and Pulmonary Disease, Chronic Obstructive .	Essential enzyme in heme catabolism	Nuclear events mediated by NFE2L2 and Inflammasomes .
HPN	D03	35,841	25,041	25,787	Prostate Cancer and Prostatic Hyperplasia, Benign .	Transmembrane Protease Serine 1	MET promotes cell motility and Signaling by MST1 .
HYOU1	D04	Undetermined	23,149	23,573	Immunodeficiency 59 and Hypoglycemia and B Cell And Dendritic Cell Deficiency .	Oxygen Regulated Protein	Unfolded Protein Response (UPR) and Cellular responses to stimuli .
ICAM1	D05	34,98	22,931	22,989	Malaria and Leukostasis .	Encodes a cell surface glycoprotein-Rhinovirus Receptor	Blood-Brain Barrier and Immune Cell Transmigration: VCAM-1/CD106 Signaling and Cytokine Signaling in Immune system .
IGFALS	D06	36,367	30,941	32,707	Acid-Labile Subunit Deficiency and Insulin-Like Growth Factor I .	Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein Complex Acid Labile Subunit	Regulation of Insulin-like Growth Factor (IGF) transport and uptake by Insulin-like Growth Factor Binding Proteins (IGFBPs) and Metabolism of proteins .
IL6ST	D07	31,805	22,969	22,24	Hyper-IgE Recurrent Infection Syndrome 4B, Autosomal Recessive and Immunodeficiency 94 With Autoinflammation And Dysmorphic Facies .	Gp130 Of The Rheumatoid Arthritis Antigenic Peptide-Bearing Soluble Form	Interleukin-6 family signaling and IL27-mediated signaling events .
IPO4	D08	39,111	25,302	25,538	Anemia, Congenital Dyserythropoietic, Type Ia .	Enable nuclear import signal receptor activity and nuclear localization sequence binding activity.	Undetermined

FAM214A	D09	Undetermined	27,791	26,575	Undetermined	Unknown-Probably immune role	Undetermined
KRT18	D10	30,725	20,898	19,232	Cryptogenic Cirrhosis and Cirrhosis, Familial.	Cytokeratin 18	ration and Nervous system development.
KRT8	D11	35,251	23,859	22,924	Cryptogenic Cirrhosis and Hidrocystoma.	Keratin, Type II Cytoskeletal 8	ration and Nervous system development.
L2HGDH	D12	Undetermined	27,576	29,725	L-2-Hydroxyglutaric Aciduria and 2-Hydroxyglutaric Aciduria.	Encodes L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase	Pyruvate metabolism and Respiratory electron transport, ATP synthesis by chemiosmotic coupling, and heat production by uncoupling proteins.
LGR5	E01	Undetermined	23,594	22,973	Ankyloglossia With Or Without Tooth Anomalies and Mucositis.	G-Protein Coupled Receptor	Signaling by WNT and ncRNAs involved in Wnt signaling in hepatocellular carcinoma.
LPL	E02	Undetermined	38,569	34,822	Hyperlipoproteinemia, Type I and Hyperlipidemia, Familial Combined, 3.	Encodes lipoprotein lipase	Plasma lipoprotein assembly, remodeling, and clearance and Familial hyperlipidemia type I.
LSS	E03	Undetermined	24,224	27,622	Cataract 44 and Hypotrichosis 14.	Catalyzes the conversion of (S)-2,3-oxidosqualene to lanosterol	superpathway of cholesterol biosynthesis and Metabolism of steroids.
MAOB	E04	Undetermined	25,741	25,981	Norrie Disease and Parkinsonism.	Adrenalin Oxidase- metabolism of neuroactive and vasoactive amines	Oxidation by cytochrome P450 and ethanol degradation II.
MAP3K6	E05	39,246	28,862	29,664	Diffuse Gastric And Lobular Breast Cancer Syndrome and Diffuse Gastric Cancer.	Apoptosis Signal-Regulating Kinase 2	TCR Signaling (Qiagen) and Angiotensin-like protein 8 regulatory pathway.
MBL2	E06	37,492	27,654	29,512	Mannose-Binding Lectin Deficiency and Vulvo vaginal Candidiasis.	Important element in the innate immune system.	Complement cascade and SARS-CoV-2 Infection.
MCM10	E07	Undetermined	27,46	28,984	Immunodeficiency 80 With Or Without Congenital Cardiomyopathy and Nk Cell Deficiency.	Involved in the initiation of eukaryotic genome replication.	Activation of the pre-replicative complex and Mitotic G1 phase and G1/S transition.
MLXIPL	E08	37,473	24,639	28,168	Williams-Beuren Syndrome and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease.	Williams Beuren Syndrome Chromosome Region 14	Integration of energy metabolism and Angiotensin-like protein 8 regulatory pathway.
MRPS18B	E09	36,818	26,109	26,11	Loeys-Dietz Syndrome 4 and Megaesophagus.	Encoded by nuclear genes and help in protein synthesis within the mitochondrion.	Mitochondrial translation and Metabolism of proteins.
NQO1	E10	30,989	20,53	20,944	Tardive Dyskinesia and Colon Adenocarcinoma.	Phylloquinone Reductase-encodes a cytoplasmic 2-electron reductase	Nuclear events mediated by NFE2L2 and Warfarin Pathway, Pharmacodynamics.
NUS1	E11	Undetermined	24,371	25,005	Congenital Disorder Of Glycosylation, Type Ia and Intellectual Developmental Disorder, Autosomal Dominant 55, With Seizures.	Encodes a type I single transmembrane domain receptor for the neural and cardiovascular regulator Nogo-B.	Synthesis of substrates in N-glycan biosynthesis and Diseases of glycosylation.
OSMR	E12	33,343	24,642	22,527	Amyloidosis, Primary Localized Cutaneous, 1 and Primary Cutaneous Amyloidosis.	Encodes a member of the type I cytokine receptor family	Akt Signaling and Interleukin-6 family signaling.
SLC51A	F01	Undetermined	27,919	26,763	Cholestasis, Progressive Familial Intrahepatic, 6 and Congenital Diarrhea.	Enable protein heterodimerization, homodimerization and transmembrane transporter activity	Synthesis of bile acids and bile salts and Metabolism
PDYN	F02	Undetermined	39,166	38,432	Spinocerebellar Ataxia 23 and Cocaine Dependence.	Proteolytically processed to form the secreted opioid peptides	GPCR downstream signalling and Class A/1 (Rhodopsin-like receptors).
PLA2G12A	F03	33,416	25,637	26,613	Coenzyme Q10 Deficiency, Primary, 9 and Cerebrooculofaci oskeletal Syndrome 1.	Liberate arachidonic acid from phospholipids for production of eicosanoids and exert a variety of physiologic and pathologic effects.	Glycerophospholipid biosynthesis and Acyl chain remodelling of PE.
PPARA	F04	38,801	25,11	25,9	Fatty Liver Disease and Liver Disease.	Respiration-cholesterol and lipid metabolism.	Circadian Clock and Gene expression (Transcription).
PSME3	F05	33,808	23,393	24,208	Systemic Lupus Erythematosus.	Multicatalytic proteinase complex	Regulation of activated PAK-2p34 by proteasome mediated degradation and

									Assembly of the pre-replicative complex.
PYGL	F06	35,922	24,086	23,459	Glycogen Storage Disease VI and Glycogen Storage Disease.	Glycogen Phosphorylase, Liver Form			Activation of cAMP-Dependent PKA and Innate Immune System.
RB1	F07	34,859	25,014	23,667	Retinoblastoma and Small Cell Cancer Of The Lung.	Negative regulator of the cell cycle and was the first tumor suppressor gene found.			Aberrant regulation of mitotic G1/S transition in cancer due to RB1 defects and Regulation of activated PAK-2p34 by proteasome mediated degradation.
RDX	F08	34,349	24,415	23,143	Deafness, Autosomal Recessive 24 and Rare Genetic Deafness.	Cytoskeletal protein that may be important in linking actin to the plasma membrane			Sensory processing of sound and Nervous system development.
RHBG	F09	35,174	25,084	28,564	Hemolytic Disease Of Fetus And Newborn, Rh- Induced and Pseudohereditary Rh-Induced Hemolytic Disease, Type I, Autosomal Recessive.	Encodes one of two non-erythroid members of the Rhesus (Rh) protein family			Transport of inorganic cations/anions and amino acids/oligopeptides.
S100A8	F10	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Peptic Ulcer Disease and Duodenal Ulcer.	Involved in cell cycle progression and differentiation.			MyD88 dependent cascade initiated on endosome and Diseases of Immune System.
SCD	F11	Undetermined	20,978	19,956	Fatty Liver Disease and Homocystinuria.	Involved in fatty acid biosynthesis, primarily the synthesis of oleic acid.			Metabolism of steroids and NR1H2 and NR1H3-mediated signaling.
SERPINA3	F12	32,553	19,969	21,13	Malignant Fibrous Histiocytoma and Alpha-1-Antitrypsin Deficiency.	Inhibit serine proteases			Response to elevated platelet cytosolic Ca2+ and Innate Immune System.
SERPINE1	G01	Undetermined	23,579	17,98	Plasminogen Activator Inhibitor-1 Deficiency and Complete Plasminogen Activator Inhibitor 1 Deficiency.	Principal inhibitor of tissue plasminogen activator (tPA) and urokinase (uPA), and hence is an inhibitor of fibrinolysis.			Response to elevated platelet cytosolic Ca2+ and Gene expression (Transcription).
SKIL	G02	Undetermined	28,718	25,659	Obstructive Nephropathy and Cornea Cancer.	Component of the SMAD pathway, which regulates cell growth			Gene expression (Transcription) and TGF-beta receptor signaling in skeletal dysplasias.
SLC17A3	G03	Undetermined	34,223	Undetermined	Uric Acid Concentration, Serum, Quantitative Trait Locus 4 and Nephrolithiasis, Uric Acid.	Sodium-Dependent Phosphate Transport Protein 4			Ion channel transport and Transport of inorganic cations/anions and amino acids/oligopeptides.
SLC2A3	G04	32,736	24,296	18,563	Huntington Disease and Acanthosis Nigricans.	Enables dehydroascorbic acid, glucose binding and glucose transmembrane transporter activity.			Gene expression (Transcription) and Innate Immune System.
SLC39A6	G05	34,874	25,362	24,84	Acrodermatitis Enteropathica, Zinc-Deficiency Type and Ehlers-Danlos Syndrome, Spondylodysplastic Type, 3.	Show structural characteristics of zinc transporters			Metal ion SLC transporters and Transport of inorganic cations/anions and amino acids/oligopeptides.
SREBF1	G06	37,406	26,675	25,995	Mucopolysaccharidosis Type I, Hereditary and Ifap Syndrome 2.	Promoter of the LDL receptor gene-sterol biosynthesis.			Metabolism of steroids and Gene expression (Transcription).
TAGLN	G07	34,046	23,86	23,609	Peyronie Disease and Werner Syndrome.	Involved in calcium independent smooth muscle contraction			PDGFR-beta signaling pathway and Burn wound healing.
THRSP	G08	Undetermined	35,117	35,04	Undetermined	Lipogenic Protein			Metabolism and Fatty acid metabolism.
TMEM2	G09	36,961	23,805	22,194	Inguinal Hernia and Hypertelorism.	pe II transmembrane protein			Undetermined
TXNRD1	G10	35,578	23,19	20,289	Hemochromatosis and Keshan Disease.	Encodes a member of the thioredoxin (Trx) system.			Nuclear events mediated by NFE2L2 and Gene expression (Transcription).
WIPI1	G11	35,35	24,893	25,122	Neurodegeneration With Brain Iron Accumulation 5 and Neurodegeneration With Brain Iron Accumulation.	Encodes a WD40 repeat protein			Unfolded Protein Response (UPR) and Autophagy.
YRDC	G12	Undetermined	25,322	24,768	Galloway-Mowat Syndrome 10 and Galloway-Mowat Syndrome.	Enable nucleotidyltransferase activity and tRNA binding activity.			Undetermined

ACTB	H01	29,507	18,544	18,81	Dystonia, Juvenile-Onset and Baraitser-Winter Syndrome 1 .	Encodes one of six different actin proteins- involved in cell motility, structure, integrity, and intercellular signaling.	Signaling downstream of RAS mutants and Regulation of actin dynamics for phagocytic cup formation .
B2M	H02	32,47	22,013	21,42	Immunodeficiency 43 and Amyloidosis, Familial Visceral .	Encodes a serum protein found in MHC class I heavy chain on the surface of nearly all nucleated cells.	SARS-CoV-2 Infection and Antigen processing-Cross presentation .
GAPDH	H03	29,12	20,408	18,001	Microcephaly 21, Primary, Autosomal Recessive and Schistosomiasis .	Aging-Associated Gene 9Protein	Glycolysis (BioCyc) and gluconeogenesis III .
HPRT1	H04	36,249	25,133	23,947	Lesch-Nyhan Syndrome and Hyperuricemia, Hprt-Related .	central role in the generation of purine nucleotides through the purine salvage pathway.	Nucleotide salvage and Thiopurine Pathway . Pharmacokinetics/Pharmacodynamics .
RPLP0	H05	27,866	18,841	17,769	Chagas Disease and Mixed Connective Tissue Disease .	Neutral Ribosomal Phosphoprotein P0	Peptide chain elongation and rRNA processing in the nucleus and cytosol .
HGDC	H06	34,141	34,7	35,988	Blepharochelidontic Syndrome 1 and Diffuse Gastric And Lobular Breast Cancer Syndrome .	Calcium-Dependent Adhesion Protein, Epithelial	Cell junction organization and Signaling by Rho GTPases .
RTC	H07	21,542	21,761	22,607			
RTC	H08	21,528	21,792	22,576			
RTC	H09	21,533	21,789	22,522			
PPC	H10	19,251	19,113	19,171			
PPC	H11	19,126	18,969	18,973			
PPC	H12	19,151	19,105	19,044			

Πίνακας 31: Λειτουργία γονιδίων και μονοπάτια που επηρεάζουν στον οργανισμό (Gene Database, 2023)

Ειδικότερα τα γονίδια που χρησιμοποιούνται κατατάσσονται στις εξής κατηγορίες:

- Χολέσταση:** ABCB1 (MDR1, PGY1) , ABCB4 , ABCC2 (MRP2, cMOAT) , ABCC3 (MRP3,MOAT-D), ATP8B1 , ICAM1 , PDYN , RDX , SLC51A .
- Στεάτωση:**
Up-Regulated in Steatosis: CD36 , FASN , LPL , SCD .
Down-Regulated in Steatosis: PPARA , SREBF1 .
- Φωσφολιπίδωση:**
Up-Regulated in Phospholipidosis: ASAH1 , FABP1 , HPN , LSS , MRPS18B , S100A8 , SERPINA3 , WIPI1 .
Down-Regulated in Phospholipidosis: SLC2A3 , TAGLN .Regulated in Phospholipidosis: ABCB1 (MDR1, PGY1) , TIMM10B .
- Ηπατοτοξικότητα:**
Up-Regulated in Hepatotoxicity: ALDOA , APEX1 , BTG2 , CASP3 , CCNG1 , CRYL1, DDIT4L (REDD2), DNAJB11, DNAJC3 , GADD45A , GCLC ,

GSR , HMOX1 , HYOU1 , KRT18 , KRT8 , NQO1 , PLA2G12A , SLC17A3 , TXNRD1 , YRDC .

Down-Regulated in Hepatotoxicity: AVPR1A , BHMT , CA3 , CXCL12 (SDF1) , CYP1A2 , FADS1 , FMO1 , HAO2 , IGFALS , MBL2 , RB1 , THRSF .

Regulated in Hepatotoxicity: ABCB11 , MAOB , PYGL , TIMM10B .

5. **Μη γονοτοξική Ηπατοκαρκινογένεση:**

Up-Regulated in Nongenotoxic Hepatocarcinogenicity: ALDOA , APEX1 , BTG2 , CCNG1 , CDKN1A(p21CIP1, WAF1) , DDX39A , KRT18 , KRT8 , MRPS18B , TXNRD1 .

6. **Νέκρωση:**

Up-Regulated in Necrosis: CD68 , CEMIP2 , COL4A1 , IL6ST (GP130) , IPO4 , MAP3K6 , NUS1 , OSMR , PSME3 , SERPINE1 (PAI-1) , SKIL , SLC39A6 .

Down-Regulated in Necrosis: CDC14B , EMC9 , FAM214A , L2HGDH , LGR5 , MCM10 , MLXIPL , RHBG .

Regulated in Necrosis: CDKN1A (p21CIP1, WAF1) , DDX39A .

Όλες οι παραπάνω δράσεις ανοίγουν τον δρόμο για την επίδραση του μείγματος σε ποικίλα μεταβολικά μονοπάτια. Όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα μερικά από τα πιο σημαντικά είναι τα εξής:

1. GPCR σηματοδότηση και κατηγορία A / 1 (υποδοχείς τύπου ροδοψίνης)
2. Φθίνουσα σηματοδότηση GPCR
3. Στον μεταβολισμό και στην αναστρέψιμη ενυδάτωση διοξειδίου του άνθρακα.
4. Στον τριμερισμό της αλυσίδας του κολλαγόνου
5. Στην οδό ιντεγκρίνης
6. Στις αποπτωτικές οδούς σε αρθρικούς ινοβλάστες
7. Στη ρύθμιση γλυκοκορτικοειδών με μεσολάβηση MIF
8. Φαρμακοκινητικά-Φαρμακοδυναμικά μονοπάτια
9. Μεταπαθητικός βιομετασχηματισμός Φάσης I και II
10. MTOR σηματοδότησης
11. Οδός Ιμπραμίνης / Δεσιπραμίνης, Φαρμακοκινητική
12. Υπεροξυσωμικός μεταβολισμός λιπιδίων

13. Μεταβολισμό
14. Ρύθμιση της μεταφοράς και πρόσληψης αυξητικού παράγοντα τύπου ινσουλίνης (IGF) από πρωτεΐνες δέσμευσης αυξητικού παράγοντα τύπου ινσουλίνης (IGFBPs)
15. Μεταβολισμό πρωτεϊνών
16. Δημιουργία λιποπρωτεϊνών πλάσματος, αναδιαμόρφωση, και κάθαρση
17. Οικογενή υπερλιπιδαιμία τύπου 1
18. Μεταφορά διαύλων ιόντων
19. Μεταφορά ανόργανων κατιόντων / ανιόντων και αμινοξέων/ολιγοπεπτιδίων
20. Μεταβολισμό λιπαρού οξέως
21. Μεταβολισμό στεροειδών
22. Μεταβολισμό υδατοδιαλυτών βιταμινών και συμπαραγόντων
23. Σηματοδότησης με μεσολάβηση NR1H2 και NR1H3
24. Ανταπόκριση σε αυξημένα επίπεδα κυτοσολικού Ca^{2+} αιμοπεταλίων
25. Έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα
26. Αποικοδόμησης χολίνης στο μεταβολισμό L-σερίνης
27. Μεταβολισμός πυροσταφυλικού και αναπνευστικού μεταφοράς ηλεκτρονίων
28. Ρυθμιστική οδός πρωτεΐνης 8 τύπου Αγγειοποιητίνης.
29. Σηματοδότηση TCR
30. Συμπλήρωμα cascade και λοίμωξη SARS - CoV-2.
31. Ενεργοποίηση του προ-αντιγραφικού συμπλόκου
32. Ενεργοποίηση της μιτωτικής φάσης G1 και της μετάβασης G1/S
33. Γονιδιακή έκφραση (μεταγραφή).
34. Ανοσοποιητικό σύστημα
35. Ανταπόκριση σε αυξημένα επίπεδα κυτοσολικού Ca^{2+} αιμοπεταλίων

4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, με βάση όλα τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρείται μια ομαλή μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων, λόγω της επίδρασης των μειγμάτων ελαιοκάρπου με αντιοξειδωτικά. Μια φυσιολογική μείωση των κυττάρων λοιπόν έγινε εμφανής τόσο μετά την χορήγηση διαφορετικών συγκεντρώσεων των μειγμάτων όσο και μετά την χορήγηση τους σε χρονικό διάστημα 24-120 ωρών. Παράλληλα, προέκυψε ότι η χορήγηση των αντιοξειδωτικών ως χημικές μορφές - καθαρές βιταμίνες εμφάνισε μεγαλύτερη τοξικότητα σε σύγκριση με την χορήγηση τους ως φυσικά εκχυλίσματα. Όσον αφορά το δοσοεξαρτώμενο πείραμα παρατηρήθηκε ότι όλες οι συγκεντρώσεις εμφάνιζαν χαμηλή τοξικότητα, μέσα στα επιτρεπτά όρια και γι αυτό τον λόγο έγινε μετέπειτα χρήση της μεγαλύτερης συκέντρωσης (10 μg), ώστε τα αποτελέσματα να εμφανίζουν πιο διακριτές αλλαγές. Επιπλέον, όσον αφορά το χρονοεξαρτώμενο πείραμα προέκυψαν μεγαλύτερης διαβάθμισης αλλαγές, γεγονός που υποδηλώνει συσχέτιση του αποτελέσματος με το χρόνο επώασης. Συγκεκριμένα, η βιωσιμότητα των κυττάρων παρουσιάζει μια σταδιακή μείωση με την πάροδο του χρόνου.

Όσον αφορά το γονιδιακό έλεγχο παρατηρείται ευκολότερη έκφραση των εξεταζόμενων γονιδίων ηπατοτοξικότητας, με δύο και τρία γονίδια από το σύνολο των 84 να παραμένουν ανέκφραστα σε σύγκριση των μειγμάτων με το control δείγμα. Παράλληλα, ένα πολύ μεγάλο ποσοστό των γονιδίων εμφανίζει ενεργοποιημένη έκφραση στα εξεταζόμενα μείγματα σε σχέση με το control δείγμα, καθιστώντας τα μείγματα ικανά να επέμβουν σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια. Επιπλέον, δεν παρατηρείται σε κανένα από τα δύο μείγματα διακοπή έκφρασης κάποιου γονιδίου το οποίο να εκφραζόταν στο control δείγμα (δείγμα ελέγχου). Μετά από σύγκριση των αποτελεσμάτων των δύο μειγμάτων προκύπτει ότι το μείγμα 1A εμφανίζει πιο έντονες αλλαγές με μεγαλύτερη Fold Up και Fold Down Regulation στα περισσότερα γονίδια. Επίσης, εμφανίζει αρκετά υψηλές τιμές σε ορισμένα γονίδια, όπως το BHMT και MAP3K6, σε σύγκριση με το δείγμα 2A του οποίου οι τιμές δεν είναι αξιοσημείωτες. Τέλος, και στα δύο μείγματα όπως και στο control συνεχίζουν να μένουν ανέκφραστα τα γονίδια ABCB11 (A02) & S100A8 (F10) ενώ στο δείγμα 2A παραμένει ανέκφραστο και το γονίδιο SLC17A3(G03).

Με βάση τον γονιδιακό έλεγχο τα μείγματα εμφανίζουν σημαντικές δράσεις στον μεταβολισμό των τριγλυκεριδίων. και συγκεκριμένα στην ρύθμιση χολιστερόλης και στην κάθαρση λιπιδίων από τη ροή του αίματος. Επίσης, παρουσιάζουν αντι-αγγειογόνες και κατασταλτικές ιδιότητες όγκου και παράλληλα έχουν κατασταλτικές ιδιότητες έναντι στον οξειδωτικό μεταβολισμό συστατικών και του οξειδωτικού στρες. Επιπλέον, συμβάλουν στη μείωση της βλάβης αντιγραφής του DNA, την ενίσχυση του κυτταρικού κύκλου και τη διευκόλυνση της εκτέλεσης των αποπτωτικών διαδικασιών.

Τα προαναφερθέντα ευρήματα υποστηρίζουν την ανάγκη για περαιτέρω έρευνα για την αξιολόγηση των πιθανών επιπτώσεων των φυσικών προϊόντων, ιδιαίτερα του ελαιόκαρπου, στη βελτίωση της συμπτωματολογίας σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες, συμπεριλαμβανομένης της νόσου του Αλτσχάιμερ. Επιπλέον, η παρούσα εργασία έγινε ως συνέχεια προηγούμενης εργασίας που έγινε στο εργαστήριο Φαρμακολογίας (Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία της Προδρόμου Σοφίας) και συλλογικά έχουν ως στόχο την αξιολόγηση και δημιουργία τέτοιων σκευασμάτων υποβοήθησης της νόσου του Alzheimer σε συνεργατική δράση με τα κύρια έξι εγκεκριμένα φάρμακα, τα οποία χρησιμοποιούνται πιο συχνά για τη θεραπεία της νόσου στις μέρες μας.

5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abubakar, M. B., Sanusi, K. O., Ugusman, A., Mohamed, W., Kamal, H., Ibrahim, N. H., Khoo, C. S., et al. (2022). Alzheimer's Disease: An Update and Insights Into Pathophysiology. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *14*, 742408. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9006951/>
- Algarni, A. A., Bima, A. I., & Elsamanoudy, A. Z. (2020). The Potential Use of Blood, Cerebrospinal Fluid, Saliva and Urine as Biological Samples for the Diagnosis of Alzheimer's Disease. *International Journal of Biochemistry Research & Review*, 26–41.
- Altmann, A., Tian, L., Henderson, V. W., & Greicius, M. D. (2014). Sex modifies theAPOE-related risk of developing Alzheimer disease. *Annals of Neurology*, *75*(4), 563–573.
- Ansari, N., & Khodagholi, F. (2013). Natural Products as Promising Drug Candidates for the Treatment of Alzheimer's Disease: Molecular Mechanism Aspect. *Current Neuropharmacology*, *11*(4), 414–429. Retrieved February 6, 2023, from <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cn/2013/00000011/00000004/art00005>
- Appleby, B. S., Nacopoulos, D., Milano, N., Zhong, K., & Cummings, J. L. (2013). A Review: Treatment of Alzheimer's Disease Discovered in Repurposed Agents. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, *35*(1-2), 1–22. Retrieved February 6, 2023, from <https://www.karger.com/Article/Abstract/345791>
- Auld, D. S., Kornecook, T. J., Bastianetto, S., & Quirion, R. (2002). Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Progress in Neurobiology*, *68*(3), 209–245. Retrieved March 25, 2021, from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12450488/>
- Banks, W. A. (2009). Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier. *BMC Neurology*, *9*(Suppl 1), S3. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2697631/>
- Baquero, M. (2015). Depressive symptoms in neurodegenerative diseases. *World Journal of Clinical Cases*, *3*(8), 682.
- Barage, S. H., & Sonawane, K. D. (2015). Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*, *52*, 1–18.
- Barbaro, B., Toietta, G., Maggio, R., Arciello, M., Tarocchi, M., Galli, A., & Balsano, C. (2014). Effects of the Olive-Derived Polyphenol Oleuropein on Human Health. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(10), 18508–18524. Retrieved March 31, 2021, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4227229/>
- Barner, E. L., & Gray, S. L. (1998). Donepezil Use in Alzheimer Disease. *Annals of Pharmacotherapy*, *32*(1), 70–77.
- Barnham, K. J., Masters, C. L., & Bush, A. I. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nature Reviews Drug Discovery*, *3*(3), 205–214. Retrieved from <https://www.nature.com/articles/nrd1330>
- Boskou, D., Camposeo, S., & Clodoveo, M. L. (2015, January 1). 8 - Table Olives as Sources of Bioactive Compounds. (D. Boskou, Ed.) *ScienceDirect*. AOCs Press. Retrieved February 7, 2023, from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781630670412500148>
- Brown, R. C., Lockwood, A. H., & Sonawane, B. R. (2005). Neurodegenerative Diseases: An Overview of Environmental Risk Factors. *Environmental Health Perspectives*, *113*(9), 1250–1256. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1280411/>
- Cao, J., Hou, J., Ping, J., & Cai, D. (2018). Advances in developing novel therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, *13*(1). Retrieved from <https://molecularneurodegeneration.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s13024-018-0299-8>
- Carnevale, D., Perrotta, M., Lembo, G., & Trimarco, B. (2015). Pathophysiological Links Among Hypertension and Alzheimer's Disease. *High Blood Pressure & Cardiovascular Prevention*, *23*(1), 3–7.
- Casey, D. A., Antimisiaris, D., & O'Brien, J. (2010). Drugs for Alzheimer's disease: are they effective? *P & T: a peer-reviewed journal for formulary management*, *35*(4), 208–11. MediMedia USA, Inc. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2873716/>
- Castellani, R. J., Rolston, R. K., & Smith, M. A. (2010). Alzheimer Disease. *Disease-a-Month*, *56*(9), 484–546.
- Chong, M. S., & Sahadevan, S. (2005). Preclinical Alzheimer's disease: diagnosis and prediction of progression. *The Lancet Neurology*, *4*(9), 576–579.

- Cicerale, S., Conlan, X. A., Sinclair, A. J., & Keast, R. S. J. (2008). Chemistry and Health of Olive Oil Phenolics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(3), 218–236.
- Cordero, J. G., García-Escudero, R., Avila, J., Gargini, R., & García-Escudero, V. (2018). Benefit of Oleuropein Aglycone for Alzheimer's Disease by Promoting Autophagy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, e5010741. Retrieved February 6, 2023, from <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2018/5010741/>
- Crismon, M. L. (1994). Tacrine: First Drug Approved for Alzheimer's Disease. *Annals of Pharmacotherapy*, 28(6), 744–751.
- Cummings, J., Lee, G., Zhong, K., Fonseca, J., & Taghva, K. (2021). Alzheimer's disease drug development pipeline: 2021. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 7(1).
- deToledo-Morrell, L., Stoub, T. R., Bulgakova, M., Wilson, R. S., Bennett, D. A., Leurgans, S., Wu, J., et al. (2004). MRI-derived entorhinal volume is a good predictor of conversion from MCI to AD. *Neurobiology of Aging*, 25(9), 1197–1203.
- Dey, A., Bhattacharya, R., Mukherjee, A., & Pandey, D. K. (2017). Natural products against Alzheimer's disease: Pharmaco-therapeutics and biotechnological interventions. *Biotechnology Advances*, 35(2), 178–216. Retrieved August 26, 2019, from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975016301604>
- Dokholyan, N. V., Mohs, R. C., & Bateman, R. J. (2022). Challenges and progress in research, diagnostics, and therapeutics in Alzheimer's disease and related dementias. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 8(1).
- Essa, M. M., Vijayan, R. K., Castellano-Gonzalez, G., Memon, M. A., Braidy, N., & Guillemin, G. J. (2012). Neuroprotective Effect of Natural Products Against Alzheimer's Disease. *Neurochemical Research*, 37(9), 1829–1842. Retrieved from <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11064-012-0799-9>
- Farina, N., Isaac, M. G. E. K. N., Clark, A. R., Rusted, J., & Tabet, N. (2012). Vitamin E for Alzheimer's dementia and mild cognitive impairment. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 11, CD002854. Retrieved March 18, 2022, from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23152215/>
- Forlenza, O. V., Diniz, B. S., & Gattaz, W. F. (2010). Diagnosis and biomarkers of predementia in Alzheimer's disease. *BMC Medicine*, 8(1).
- Galts, C. P. C., Bettio, L. E. B., Jewett, D. C., Yang, C. C., Brocardo, P. S., Rodrigues, A. L. S., Thacker, J. S., et al. (2019). Depression in neurodegenerative diseases: Common mechanisms and current treatment options. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 102, 56–84.
- Garriga, M., Milà, M., Mir, M., Al-Baradie, R., Huertas, S., Castejon, C., Casas, L., et al. (2015). 123I-FP-CIT SPECT imaging in early diagnosis of dementia in patients with and without a vascular component. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 9.
- Goedert, M., & Spillantini, M. G. (2006). A century of Alzheimer's disease. *Science (New York, N.Y.)*, 314(5800), 777–81. United States. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17082447>
- Govindaraju, T. (2022). *Alzheimer's Disease: Recent Findings in Pathophysiology, Diagnostic and Therapeutic Modalities*. Google Books. Royal Society of Chemistry. Retrieved February 6, 2023, from <https://books.google.gr/books?hl=en&lr=&id=kXBYEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT17&dq=Alzheimer%27s+Disease:+Recent+Findings+in+Pathophysiology>
- Govindaraju, T., & Ramesh, M. (2022). Multipronged diagnostic and therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Chemical Science*.
- Graham, N. S., & Sharp, D. J. (2019). Understanding neurodegeneration after traumatic brain injury: from mechanisms to clinical trials in dementia. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 90(11), 1221–1233. Retrieved from <https://jnnp.bmj.com/content/early/2019/09/24/jnnp-2017-317557.long>
- Grimm, M. O. W., Zimmer, V. C., Lehmann, J., Grimm, H. S., & Hartmann, T. (2013). The Impact of Cholesterol, DHA, and Sphingolipids on Alzheimer's Disease. *BioMed Research International*, 2013, 1–16.
- Grundman, M. (2000). Vitamin E and Alzheimer disease: the basis for additional clinical trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(2), 630S636S. Retrieved from <https://academic.oup.com/ajcn/article/71/2/630S/4729332>
- Guimarães, A. G., Singla, R. K., & Zengin, G. (2022). *Application of Plant Secondary Metabolites to Pain Neuromodulation, Volume II*. Google Books. Frontiers Media SA. Retrieved February 6,

- 2023, from <https://books.google.gr/books?hl=en&lr=&id=FM-aEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA74&dq=Bhat+et+al>.
- Hampel, H., Mesulam, M.-M., Cuello, A. C., Khachaturian, A. S., Vergallo, A., Farlow, M. R., Snyder, P. J., et al. (2018). REVISITING THE CHOLINERGIC HYPOTHESIS IN ALZHEIMER'S DISEASE: EMERGING EVIDENCE FROM TRANSLATIONAL AND CLINICAL RESEARCH. *The Journal Of Prevention of Alzheimer's Disease*, 1–14.
- Hampel, H., Mesulam, M.-M., Cuello, A. C., Farlow, M. R., Giacobini, E., Grossberg, G. T., Khachaturian, A. S., et al. (2018). The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain*, *141*(7), 1917–1933. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6022632/>
- Haris Omar, S. (2010). Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects. *Scientia Pharmaceutica*, *78*(2), 133–154.
- Herrlinger, C., & Klotz, U. (2001). Drug metabolism and drug interactions in the elderly. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, *15*(6), 897–918. Retrieved February 12, 2021, from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11866484/>
- Huang, W.-J., Zhang, X., & Chen, W.-W. (2016). Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomedical Reports*, *4*(5), 519–522.
- Huang, Y., & Mucke, L. (2012). Alzheimer Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Cell*, *148*(6), 1204–1222. Retrieved August 8, 2019, from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867412002784>
- Hung, C.-W., Chen, Y.-C., Hsieh, W.-L., Chiou, S.-H., & Kao, C.-L. (2010). Ageing and neurodegenerative diseases. *Ageing Research Reviews*, *9*, S36–S46.
- Iqbal, K., Liu, F., Gong, C.-X., Alonso, A. del C., & Grundke-Iqbal, I. (2009). Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. *Acta Neuropathologica*, *118*(1), 53–69.
- Jack, C. R. (2011). Alliance for Aging Research AD Biomarkers Work Group: structural MRI. *Neurobiology of Aging*, *32*, S48–S57.
- Jann, M. W. (2000). Rivastigmine, a New-Generation Cholinesterase Inhibitor for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Pharmacotherapy*, *20*(1), 1–12.
- Jelic, V., Johansson, S.-E., Almkvist, O., Shigeta, M., Julin, P., Nordberg, A., Winblad, B., et al. (2000). Quantitative electroencephalography in mild cognitive impairment: longitudinal changes and possible prediction of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *21*(4), 533–540.
- Johnson, R. L., & Mitchell, A. E. (2018). Reducing Phenolics Related to Bitterness in Table Olives. *Journal of Food Quality*, *2018*, 1–12.
- Laurent, C., Eddarkaoui, S., Derisbourg, M., Leboucher, A., Demeyer, D., Carrier, S., Schneider, M., et al. (2014). Beneficial effects of caffeine in a transgenic model of Alzheimer's disease-like tau pathology. *Neurobiology of aging*, *35*(9), 2079–90. United States. Retrieved September 12, 2019, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24780254>
- Lilienfeld, S. (2002). Galantamine--a novel cholinergic drug with a unique dual mode of action for the treatment of patients with Alzheimer's disease. *CNS drug reviews*, *8*(2), 159–176. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12177686>
- Liu, Q., Xie, F., Rolston, R., Moreira, P. I., Nunomura, A., Zhu, X., Smith, M. A., et al. (2007). Prevention and treatment of Alzheimer disease and aging: antioxidants. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, *7*(2), 171–180. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17305591/>
- Long, J. M., & Holtzman, D. M. (2019). Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell*, *179*(2), 312–339. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867419310074>
- Maccora, J., Peters, R., & Anstey, K. J. (2020). What does (low) education mean in terms of dementia risk? A systematic review and meta-analysis highlighting inconsistency in measuring and operationalising education. *SSM - Population Health*, *12*(100654), 100654.
- Markesbery, W. R. (1997). Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Free Radical Biology and Medicine*, *23*(1), 134–147.
- Maslow, K. (2010). 2010 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, *6*(2), 158–194.
- Mattson, M. P. (1997). Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiological Reviews*, *77*(4), 1081–1132.
- McMillan, J. M., Mele, B. S., Hogan, D. B., & Leung, A. A. (2018). Impact of pharmacological treatment of diabetes mellitus on dementia risk: systematic review and meta-analysis. *BMJ Open Diabetes Research & Care*, *6*(1), e000563. Retrieved May 18, 2019, from <https://drc.bmj.com/content/6/1/e000563>

- Mendez, M. F. (2017). What is the Relationship of Traumatic Brain Injury to Dementia? *Journal of Alzheimer's Disease*, 57(3), 667–681.
- Mendiola-Precoma, J., Berumen, L. C., Padilla, K., & Garcia-Alcocer, G. (2016, July 28). Therapies for Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease. *BioMed Research International*. Retrieved from <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/2589276/>
- Mohajeri, M. H., Troesch, B., & Weber, P. (2015). Inadequate supply of vitamins and DHA in the elderly: Implications for brain aging and Alzheimer-type dementia. *Nutrition*, 31(2), 261–275.
- Noori, T., Dehpour, A. R., Sureda, A., Sobarzo-Sanchez, E., & Shirooie, S. (2021). Role of natural products for the treatment of Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmacology*, 898(173974), 173974.
- Patrick, R. P. (2018). Role of phosphatidylcholine-DHA in preventing APOE4-associated Alzheimer's disease. *The FASEB Journal*, 33(2), 1554–1564.
- Peñalver, R., Lorenzo, J. M., Ros, G., Amarowicz, R., Pateiro, M., & Nieto, G. (2020). Seaweeds as a Functional Ingredient for a Healthy Diet. *Marine Drugs*, 18(6). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7345263/>
- Porsteinsson, A. P., Isaacson, R. S., Knox, S., Sabbagh, M. N., & Rubino, I. (2021). Diagnosis of early Alzheimer's Disease: Clinical practice in 2021. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*, 8(3), 1–16.
- Praticò, D. (2008). Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease: a reappraisal. *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(12), 609–615.
- Prvulovic, D., Hampel, H., & Pantel, J. (2010). Galantamine for Alzheimer's disease. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 6(3), 345–354.
- Puzzo, D., Privitera, L., Leznik, E., Fa, M., Staniszewski, A., Palmeri, A., & Arancio, O. (2008). Picomolar Amyloid- Positively Modulates Synaptic Plasticity and Memory in Hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 28(53), 14537–14545.
- Quinn, J. F., Raman, R., Thomas, R. G., Yurko-Mauro, K., Nelson, E. B., Van Dyck, C., Galvin, J. E., et al. (2010). Docosahexaenoic Acid Supplementation and Cognitive Decline in Alzheimer Disease. *JAMA*, 304(17), 1903. Retrieved November 12, 2019, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3259852/>
- Rajasekhar, K., & Govindaraju, T. (2018). Current progress, challenges and future prospects of diagnostic and therapeutic interventions in Alzheimer's disease. *RSC Advances*, 8(42), 23780–23804. Retrieved from <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2018/ra/c8ra03620a>
- Ramos, A., Joshi, R. S., & Szabo, G. (2022). Innate immune activation: Parallels in alcohol use disorder and Alzheimer's disease. *ProQuest*. Retrieved February 6, 2023, from <https://www.proquest.com/docview/2712132444?pq-origsite=gscholar&fromopenview=true>
- Remmer, H. (1970). The role of the liver in drug metabolism. *The American Journal of Medicine*, 49(5), 617–629. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0002934370801292>
- Rhein, V., Song, X., Wiesner, A., Ittner, L. M., Baysang, G., Meier, F., Ozmen, L., et al. (2009). Amyloid- and tau synergistically impair the oxidative phosphorylation system in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(47), 20057–20062.
- Robinson, D. M., & Keating, G. M. (2006). Memantine. *Drugs*, 66(11), 1515–1534. Retrieved from <https://link.springer.com/article/10.2165%2F00003495-200666110-00015#citeas>
- Rogawski, M. A., & Wenk, G. L. (2006). The Neuropharmacological Basis for the Use of Memantine in the Treatment of Alzheimer's Disease. *CNS Drug Reviews*, 9(3), 275–308.
- Rustgi, V. (2016). *Drug Hepatotoxicity, An Issue of Clinics in Liver Disease*. Google Books. Elsevier Health Sciences. Retrieved February 6, 2023, from <https://books.google.gr/books?hl=en&lr=&id=IfoTDgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=Drug+Metabolism+in+the+Liver+Omar+Abdulhameed+Almazroo>
- Seçmeler, Ö., & Galanakis, C. M. (2019, January 1). Chapter 8 - Olive Fruit and Olive Oil. (C. M. Galanakis, Ed.) *ScienceDirect*. Woodhead Publishing. Retrieved February 6, 2023, from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128148877000083>
- Sijtsma, L., & de Swaaf, M. E. (2004). Biotechnological production and applications of the ω -3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(2), 146–153.
- Smith, M. A., Rottkamp, C. A., Nunomura, A., Raina, A. K., & Perry, G. (2000). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1502(1), 139–144. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443900000405>

- Stamer, K., Vogel, R., Thies, E., Mandelkow, E., & Mandelkow, E.-M. . (2002). Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *Journal of Cell Biology*, *156*(6), 1051–1063. Retrieved from <https://rupress.org/jcb/article/156/6/1051/1118>
- Stanzione, P., & Tropepi, D. (n.d.). New Challenges in Translational Medicine Drugs and clinical trials in neurodegenerative diseases. Retrieved November 18, 2020, from <https://www.scielo.org/pdf/aiss/2011.v47n1/49-54/en>
- Sueishi, Y., & Nii, R. (2020). A comparative study of the antioxidant profiles of olive fruit and leaf extracts against five reactive oxygen species as measured with a multiple free-radical scavenging method. *Journal of Food Science*, *85*(9), 2737–2744.
- Sun, W., Frost, B., & Liu, J. (2017). Oleuropein, unexpected benefits! *Oncotarget*, *8*(11), 17409–17409.
- Susa, S. T., & Preuss, C. V. (2022). Drug Metabolism. *PubMed*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442023/#_NBK442023_pubdet
- Tolosa, L., Gómez-Lechón, M. J., López, S., Guzmán, C., Castell, J. V., Donato, M. T., & Jover, R. (2016). Human Hepatocytes: Characterization of the Hepatic Phenotype and Evaluation for Acute and Long-Term Hepatotoxicity Routine Testing. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, *152*(1), 214–229. Retrieved May 26, 2022, from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27208088/>
- Zhang, Z., & Tang, W. (2018). Drug metabolism in drug discovery and development. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, *8*(5), 721–732.
- Zhao, Y., & Zhao, B. (2013, July 25). Oxidative Stress and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Retrieved from <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2013/316523/>
- Zhong, G., Wang, Y., Zhang, Y., Guo, J. J., & Zhao, Y. (2015). Smoking Is Associated with an Increased Risk of Dementia: A Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies with Investigation of Potential Effect Modifiers. (K. Laws, Ed.) *PLOS ONE*, *10*(3), e0118333.
- Zhu, X., Su, B., Wang, X., Smith, M. A., & Perry, G. (2007). Causes of oxidative stress in Alzheimer disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *64*(17), 2202–2210.
- Zimmet, P., Alberti, K. G., Magliano, D. J., & Bennett, P. H. (2016). Diabetes mellitus statistics on prevalence and mortality: facts and fallacies. *Nature Reviews Endocrinology*, *12*(10), 616–622.