



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ:

«ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη της βιοδιαθεσιμότητας της ενθυλακωμένης σε νανοσωματίδια EGCG
σε πλάσμα ποντικών

ΔΗΜΗΤΡΑ Ν. ΛΑΜΠΡΙΝΑΚΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: Μ. ΚΑΨΟΚΕΦΑΛΟΥ

ΑΘΗΝΑ 2015

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη της βιοδιαθεσιμότητας της ενθυλακωμένης σε
νανοσωματίδια EGCG σε πλάσμα ποντικών

ΛΑΜΠΡΙΝΑΚΗ Ν. ΔΗΜΗΤΡΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: Μ. ΚΑΨΟΚΕΦΑΛΟΥ

Α' μέλος Τριμελούς: Ι. ΜΑΝΤΑΛΑ

Β' μέλος Τριμελούς: Α.ΜΑΛΛΟΥΧΟΣ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ξεκινώντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κ. Μαρία Καψοκεφάλου, αντιπρύτανη και επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, για την ευκαιρία που μου πρόσφερε να αναλάβω και να αναπτύξω το θέμα της παρούσας εργασίας και την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε ώστε να μου επιτρέψει να εργαστώ στο εργαστήριό της, καθώς και τις γενικότερες κατευθύνσεις και βοήθεια που μου παρείχε αμέριστα.

Στην συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ.Αθανάσιο Μαλλούχο, λέκτορα του τμήματος επιστήμης τροφίμων και διατροφής του ανθρώπου στο γεωπονικό, για την συνεχή καθοδήγηση αλλά και τις πολύτιμες συμβουλές του, που ήταν καθοριστικές για την πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας, καθώς και την κ.Αυγή Γαρδέλη, η οποία, βρίσκονταν στο χώρο του εργαστηρίου ανάλυσης τροφίμων και ήταν πρόθυμη να με βοηθήσει σε κάθε απορία μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Αδελαΐδα Αθανασάτου και Όλγα Μαλισόβα, που με βοήθησαν ιδιαίτερα όσων αφορά τη “γνωριμία” μου με το εργαστήριο της διατροφής, καθώς και τις συμβουλές, γνώσεις, αλλά και στήριξη που μου πρόσφεραν κατά το διάστημα διεξαγωγής της μελέτης.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου, που βρίσκονταν στο χώρο κατά το διάστημα διεξαγωγής της μελέτης Αντώνη Κουτελιδάκη και Νάντια Αργύρη για την θετική διάθεση και βοήθεια σε ότι χρειαζόμουν.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις συμφοιτήτριες και φίλες μου Κλαίρη Παπαβασιλείου και Στέλλα Χορτιατινού, για την ηθική συμπαράσταση αλλά και για τις στιγμές που περάσαμε μαζί στον μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών, κατά την παραμονή μου στην Αθήνα τον ενάμιση αυτό χρόνο, καθώς και τους υπόλοιπους συμφοιτητές μου για τις όμορφες στιγμές, κατά την διάρκεια των μαθημάτων.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πολυφαινόλες του πράσινου τσαγιού κατέχουν ένα προστατευτικό ρόλο στον κίνδυνο παθογένεσης καθώς σε πολλές χρόνιες παθήσεις, ιδιαίτερα των καρδιαγγειακών παθήσεων και του καρκίνου. Τα ξηρά φύλλα του τσαγιού περιέχουν περίπου 30% (κατά βάρος) των πολυφαινολών, η πλειοψηφία των οποίων είναι κατεχίνες (φλαβαν-3-ολών). Η επιγαλλοκατεχίνη (EGCG) είναι η κυρίαρχη κατεχίνη στο πράσινο τσάι και είναι πολύ υδρόφιλο μόριο.

Με την ενθυλάκωση της EGCG σε νανο-δομές, φαίνεται από την βιβλιογραφία να μπορεί να επιτευχθεί αύξηση της βιοδιαθεσιμότητά της.

Σκοπός της μελέτης, ήταν η εκτίμηση της βιοδιαθεσιμότητας της EGCG στο πλάσμα ποντικών, ύστερα από την ανάπτυξη μίας απλής και ακριβής μεθόδου, με σκοπό την ποσοτικοποίησή της, στο πλάσμα ποντικών, ύστερα από χορήγηση της ουσίας EGCG σε αυτά, στην καθαρή της μορφή, σε μορφή μίγματος νερού με λάδι αλλά και υπό την μορφή νανο-σωματιδίου.

Στο πρώτο μέρος, έγιναν αναλύσεις με την δοκιμή διαφορετικών διαλυτών κινητής φάσης, έτσι ώστε να βρεθεί αυτή, η οποία θα πραγματοποιούσε τον καλύτερο διαχωρισμό με την εμφάνιση της καλύτερης κορυφής.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η γραμμικότητα της συγκέντρωσης EGCG σε σχέση με την απορρόφηση, έτσι ώστε να κατασκευαστεί η καμπύλη αναφοράς, καθώς επίσης, μελετήθηκε και η ανάκτηση της συγκέντρωσης EGCG στο πλάσμα ποντικών. Τα αποτελέσματα, έδειξαν μια καλή γραμμικότητα, όπως και ανάκτηση από το πλάσμα.

Στο τελευταίο μέρος, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις στο πλάσμα των ομάδων ποντικών. Τα αποτελέσματα έδειξαν, ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ όλων των ομάδων, χωρίς όμως να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων παρέμβασης.

Τέλος, παρατηρήθηκε, μεγάλη συγκέντρωση της EGCG στην ομάδα D (EGCG σε νερό:λάδι(80:20%)), στο όριο για να θεωρηθεί στατιστικά σημαντική συγκρινόμενη με την ομάδα C, της υδατικής EGCG.

ΑΘΗΝΑ

Λέξεις κλειδιά: πράσινο τσάι, φαινολικές ενώσεις, EGCG, νανογαλάκωμα, βιοδιαθεσιμότητα, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, ανίχνευση υπεριώδους

ABSTRACT

Polyphenols in green tea possess a protective role in the risk of pathogenesis, as in many chronic diseases, particularly cardiovascular diseases and cancer. Dried tea leaves contain about 30% (by weight) of polyphenols, the majority of which are catechins (flavan-3-ols). The epigallocatechin gallate (EGCG) is the dominant catechin in green tea and is very hydrophilic molecule.

Encapsulation of EGCG in the nano-structures, accordance with literature, can achieve an increase of its bioavailability.

The purpose of this study was to assess the bioavailability of EGCG in mice plasma after the development of a simple and accurate method for quantification, in mouse plasma after administration of EGCG substance, in its pure form, in form of a mixture of water with oil and in the form of nano-particle.

In the first part, tests were made to test a range of different mobile phase solution, in order to find, which solution would be better for the peak separation, in chromatogram, as, to give the optimum shape of peak.

Subsequently, we studied the linearity of EGCG concentration in relation to the absorption, in order to construct the standard curve, as we studied the recovery of EGCG concentration in the plasma of mice. The results showed a good linearity, and also a good recovery of EGCG in plasma.

In the last part, analyzes performed in the plasma of mice groups. The results showed that there is a statistically significant difference between all groups, but there is no statistically significant difference between the intervention groups.

Finally, it was shown, a high concentration of EGCG in group D (EGCG in water: oil (80: 20%)), line in the threshold to be considered statistically significant when compared to group C, the aqueous EGCG.

ATHENS

Keywords: green tea, phenolics, EGCG, nanoemulsion, bioavailability, HPLC, UV detection

ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ- ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- **EGCG:** (-)-gallate epigallocatechin ((-)-Γαλλική επιγαλλοκατεχίνη)
- **LDL/VLDL:** low density lipoprotein/very low density lipoprotein (χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες / πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες)
- **HDL:** high density lipoprotein (πολύ υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες)
- **v/v:** volume per volume (ογκο κατ' όγκο)
- **RR:** relative risk (σχετικός κίνδυνος)
- **OR:** odds ratio (λόγος σχετικής πιθανότητας)
- **CI:** confidence interval (διάστημα εμπιστοσύνης)
- **CAD:** coronary artery disease (στεφανιαία νόσος)
- **T2DM:** type 2 diabetes mellitus (σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2)
- **OGTT-2h:** 2h plasma glucose in the oral glucose tolerance test (στοματικό τεστ αντοχής στη γλυκόζη και ανάλυση της γλυκόζης στο πλάσμα ύστερα από 2 ώρες)
- **HOMAIR:** homeostasis model of insulin resistance (μοντέλο ομοιόστασης της αντίστασης στην ινσουλίνη)
- **UV:** ultra-violet (φασματοσκοπία υπεριώδης)
- **EDTA:** Ethylenediaminetetraacetic acid (Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ)
- **ppb:** parts per billion (ng/ml)-(μέρη ανά δισεκατομμύριο)

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
A. Εισαγωγή	9
A.1 Τσάι.....	9
A.1.1 Πράσινο τσάι	12
A.1.2 Επεξεργασία του τσαγιού.....	12
A.2 Επιπτώσεις του πράσινου τσάι στην Υγεία	16
A.2.1 Στοιχεία από Επιδημιολογικές μελέτες.....	17
A.3 Χημικά-Βιοχημικά Χαρακτηριστικά του πράσινου τσάι	26
A.3.1 Χαρακτηριστικά Κατεχινών	27
A.3.2 Δράσεις Κατεχινών	30
A.3.3 Μελέτη της γαλλικής επιγαλλοκατεχίνης (EGCG).....	36
A.4 Βιοδιαθεσιμότητα πολυφαινολών.....	41
A.5 Νανοσωματίδια EGCG	46
A.6 Υγρή Χρωματογραφία	48
ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	51
B. Υλικά και μέθοδοι.....	52
B.1 Μεταχείριση πειραματόζων –Χορήγηση EGCG.....	52
B.2 Συλλογή δείγματος	53
B.3 Οργανολογία και συνθήκες HPLC.....	53
B.4 Προετοιμασία διαλυμάτων-προτύπων EGCG	54
B.5 Δοκιμή εκχυλιστικού μέσου	56
B.6 Προετοιμασία δειγμάτων πλάσματος.....	56
B.7 Επικύρωση μεθόδου HPLC	57
B.7.1 Προετοιμασία πρότυπης Καμπύλης Αναφοράς σε πλάσμα	57
B.7.2 Προσδιορισμός γραμμικότητας.....	57
B.7.3 Ακρίβεια σε διαδοχικές ημέρες.....	58
B.7.4 Ορθότητα μεθόδου (accuracy).....	58
B.8 Ανάλυση Δεδομένων	59
Γ. Αποτελέσματα.....	60
Γ.1 Χρωματογραφικές Συνθήκες	60
Γ.2 Ορθότητα, Γραμμικότητα, Ακρίβεια	63
Γ.2.1 Ανάκτηση EGCG στο πλάσμα	63

Γ.2.2 Γραμμικότητα καμπύλης.....	63
Γ.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης EGCG στο πλάσμα	66
Δ. Συζήτηση.....	70
Ε. Συμπεράσματα-Προοπτικές και μελλοντικοί στόχοι.....	76
Ζ. Βιβλιογραφία	78

A. Εισαγωγή

A.1 Τσάι

Παγκοσμίως το τσάι κατέχει την δεύτερη θέση σε προτίμηση, μετά από το νερό όταν αναφερόμαστε σε ευφραντικά. Το τσάι ξεκίνησε να καταναλώνεται εκατομμύρια χρόνια πριν, στην Κίνα και από τότε αποτέλεσε σημαντικό κομμάτι της καθημερινότητας και των υπόλοιπων λαών. Στην Ιαπωνία, ξεκίνησε να καταναλώνεται σαν ποτό από τους μοναχούς, με σκοπό την βοήθεια στη συγκέντρωση κατά την διάρκεια του διαλογισμού. Στην Βρετανία, η κατανάλωσή του πραγματοποιούνταν από την πλούσια τάξη. Η συσχέτιση του τσαγιού με του Βρετανούς ήταν τόσο δυνατή, σε σημείο όπου οι Αμερικάνοι άποικοι, γύρω στα τέλη του 1700, να αρνούνται να αγοράσουν τσάι για να δείξουν την δυσαρέσκεια τους προς τους Βρετανούς.

Το τσάι είναι ένα ποτό που προέρχεται από το εκχύλισμα των φύλων από τον αιθιαλές θάμνο που καλείται τσάι. Τα άνθη, μίσχοι και τα φύλα των φυτών εκτός του φυτού τσάι, όπως τα φυτά μέντα και χαμομήλι, καταναλώνονται σαν εκχυλίσματα αλλά ονομάζονται αφεψήματα. Σε κάποιες περιπτώσεις τα αφεψήματα αυτά αναφέρονται σαν τσάι, αλλά ο όρος αυτός είναι εσφαλμένος καθώς δεν περιέχουν φύλλα από το φυτό τσάι.

Δύο είναι τα κύρια είδη των φυτών του τσάι που καλλιεργούνται σήμερα. Το ένα είναι το κινέζικο φυτό, που ονομάζεται *Camellia sinensis* και το δεύτερο είναι το Ινδικό φυτό *Camellia assamica*. Το φυτό του τσάι, αρχικά, αναπτύχθηκε στα βουνά των Ιμαλαΐων, μεταξύ της Ινδίας και του Θιβέτ, στην Ασία (Carrie Gleason 2007).

Τα καλλιεργήσιμα είδη των φυτών *Camellia sinensis*, είναι η πηγή της πρώτης ύλης από την οποία προέρχεται το δημοφιλές ρόφημα του τσάι, ύστερα από επεξεργασία. Τα είδη αυτά καλλιεργούνται εμπορικά στις ηπείρους: Ασία, Αφρική και Νότια Αμερική.

Οι μεγαλύτεροι παραγωγοί των καλλιεργειών είναι η Κίνα, Ινδία η Κένυα, Σρι Λάνκα και η Ινδονησία (Wachira et al. 2013) **(Εικόνα A.1.1)**.

Camellia sinensis

Το φυτό *Camellia sinensis* είναι ένα αειθαλές δέντρο ή θάμνος. Έχει κίτρινα-λευκά λουλούδια και μακριά, οδοντωτά φύλλα. Είναι 2.5-3.5 εκατοστά σε διάμετρο και έχει έξι με οκτώ πέταλα. Η άνθιση του είδους αυτού, λαμβάνει χώρα από τον Οκτώβριο έως τον Φεβρουάριο και η καρποφορία εμφανίζεται τον Αύγουστο με Οκτώβριο(Wachira et al. 2013).

Παρόλο που καλλιεργείται σε πολλές χώρες, υπάρχουν πολλά διαφορετικά είδη φυτών τσαγιού, το καθένα με διαφορετική ταυτότητα, χαρακτηριστικά και δυναμική, για ένα μοναδικής ποιότητας φλιτζάνι τσάι. Εξαιτίας της ποικιλότητας, είναι σημαντικός ο διαχωρισμός και η κατηγοριοποίηση των ειδών, καθώς και η ξεχωριστή μελέτη αυτών.

Η κατηγοριοποίηση, με την βιολογική έννοια, είναι η κατάταξη των φυτών σε μία ιεραρχία τάξεων.

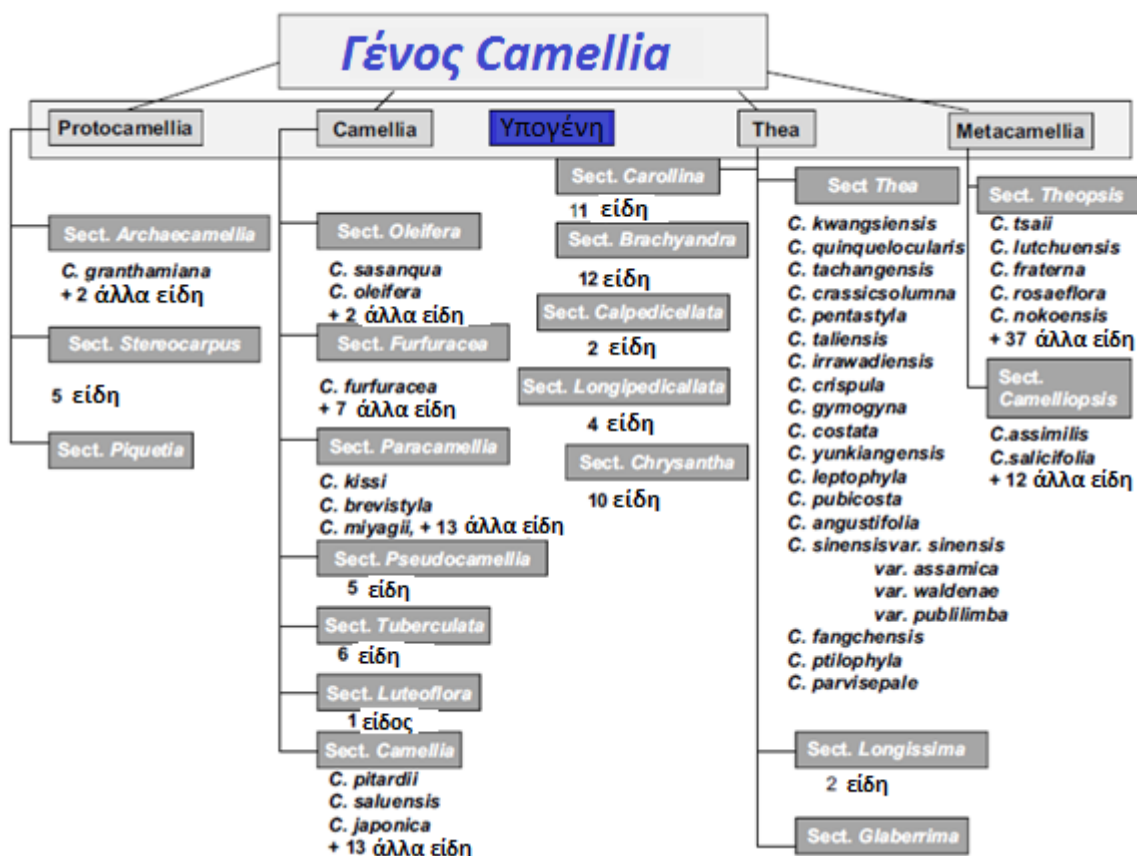
Κατηγοριοποιήσεις του γένους Camellia

Το φυτό του τσαγιού από το οποίο προκύπτει το ρόφημα του τσάι, βρίσκεται στο γένος *Camellia*. Το γένος αυτό, έχει πάνω από 200 είδη και γεωγραφικά, βρίσκεται σε μεγάλο ποσοστό, στα εγχώρια των ορεινών περιοχών του Θιβέτ, βόρεια και ανατολική Ινδία και στη νότια Κίνα.

Το γένος αυτό, από μελετητές έχει καταταχθεί σε διάφορες υποκατηγορίες. Η κατηγοριοποίηση αυτή διαφέρει από μελετητή σε μελετητή. Η πιο πρόσφατη και ολοκληρωμένη κατηγοριοποίηση, αποτελεί τον διαχωρισμό του είδους σε 4 υποομάδες, για παράδειγμα τα *Protocamellia*, *Camellia*, *Thea* και *Metacamellia* και 20 άλλα τμήματα(Wachira et al. 2013) **(Εικόνα Α.1.2)**.



Εικόνα Α.1.1 Το φυτό του τσάι αναπτύσσεται σε περισσότερες από 40 χώρες. Στον χάρτη αυτό, φαίνονται οι 10 χώρες που το παράγουν σε μεγαλύτερο ποσοστό (Carrie Gleason 2007).



Εικόνα Α.1.2 Συνοπτικό διάγραμμα που απεικονίζει τα είδη που σχετίζονται με το γένος *Camellia*. (Wachira et al. 2013)

A.1.1 Πράσινο τσάι

Το πράσινο τσάι προέρχεται από το γένος *Camellia sinensis*, το ίδιο είδος από το οποίο προέρχονται και το λευκό, μαύρο τείον, μαύρο και ru-erh τσάι.

Τα διαφορετικά είδη τσαγιού ταξινομούνται βάσει της επεξεργασίας που έχουν υποστεί, καθώς και την σχετική οξειδωση και το επίπεδο ζύμωσης το οποίο επηρεάζει το χαρακτηριστικό της γεύσης και του αρώματος.

Το πράσινο τσάι, είναι ένα μερικώς οξειδωμένο και μη ζυμωμένο τσάι. Οι πολυφαινόλες, είναι οι κύριες ενώσεις που ευθύνονται για τα οφέλη που αναφέρονται για το πράσινο τσάι στην υγεία, συμπεριλαμβανομένου και των αντιοξειδωτικών και αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων του. Η καφεΐνη, συνεισφέρει στην διεγερτική ιδιότητα του πράσινου τσαγιού, ενώ το αμινοξύ, θειανίνη συνεισφέρει στη χαλαρωτική ιδιότητα του. Τα ποσοστά καφεΐνης και κατεχίνης που βρίσκονται στο πράσινο τσάι διαφοροποιούνται σημαντικά μεταξύ των φυτών και η παρουσία τους εξαρτάται από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες ανάπτυξης και επεξεργασίας.

Η Κίνα είναι το κέντρο από όπου έχει τις ρίζες του, στην παραγωγή, το πράσινο τσάι. Η παραγωγή του, πλέον συμβαίνει σε περισσότερες από 20 χώρες σε τροπικές, υπο-τροπικές και εύκρατες περιοχές. Είναι το πιο ευρέως καταναλώσιμο ρόφημα, λόγω των πολύτιμων ιδιοτήτων του.

Η ποιότητα του πράσινου τσαγιού, εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, εκ των οποίων η καλλιέργεια, η συγκομιδή, η επεξεργασία, η αποθήκευση και προετοιμασία, οι οποίοι, μπορεί να επηρεάσουν την χημεία, τη γεύση, το άρωμα, τη μορφολογία και τη βιοδραστικότητα των φύλλων του τσαγιού(Wachira et al. 2013).

A.1.2 Επεξεργασία του τσαγιού

Ένα φλιτζάνι τσάι που έχει προκύψει από επεξεργασμένα φύλλα, έχει γεύση, μυρίζει και φαίνεται σημαντικά διαφορετικό από το εκχύλισμα ενός φρέσκου φύλλου τσάι, διότι συμβαίνουν μια σειρά από βιοχημικές αλλαγές κατά την επεξεργασία του. Τα φρέσκα φύλλα τσάι, έχουν μία πικρή γεύση και είναι πλούσια σε πτητικές ενώσεις και πρόδρομες ουσίες του χαρακτηριστικού αρώματος.

Η επεξεργασία, είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες για τη γεύση και προάγει την ανάπτυξη των πτητικών ενώσεων, μειώνει την πικρότητα,

απενεργοποιεί τα ένζυμα, μειώνει το περιεχόμενο της υγρασίας και μετατρέπει το φρέσκο πράσινο φύλλο σε έξι διαφορετικά χρώματα, που χρησιμοποιούνται για την κατηγοριοποίηση του τσαί σε: λευκό, πράσινο, κίτρινο, μπλε-πράσινο, κόκκινο και μαύρο.

Τα πρωταρχικά βήματα της επεξεργασίας του πράσινου τσαί, που ακολουθούν μετά την συγκομιδή, περιλαμβάνουν:

- *το άπλωμα*: προαγωγή της υδρόλυσης των μη υδατοδιαλυτών υδατανθράκων και πηκτινών, δημιουργία και συσσώρευση των μη-γαλλικών κατεχινών, απελευθέρωση της χαρακτηριστικής χορτάρινης οσμής των φρέσκων φύλλων και εξάτμιση, μέρος της υγρασίας, των φρέσκων φύλλων. Περίπου το 30% της υγρασίας που περιέχεται στα φύλλα, χάνεται κατά την διαδικασία του απλώματος και τα προετοιμάζει για την επόμενη διαδικασία, της βελτίωσης.
- *την βελτίωση*: Τα φρέσκα φύλλα τσαί εκτίθενται σε θέρμανση για περίπου 10-15 λεπτά. Η διαδικασία αυτή, απενεργοποιεί τα ένζυμα στους βλαστούς του φύλλου έτσι ώστε να απενεργοποιηθεί η οξειδωση, η ζύμωση και να διατηρηθεί το πράσινο χρώμα. Η διαδικασία αυτή εξυπηρετεί στην ξήρανση των φύλλων. Υπολογίζεται, περίπου το 40% του περιεχομένου των φύλλων σε νερό, να χάνεται κατά την επεξεργασία αυτή. Κατά το στάδιο αυτό, συχνά, προσαρμόζεται η θερμοκρασία, σε υψηλές τιμές στην αρχή και χαμηλότερες, προς το τέλος αυτής της επεξεργασίας. Οι χαμηλές τιμές θερμοκρασίας, έχουν ως αποτέλεσμα, την δημιουργία ερυθρότητας στο φύλλωμα. Υπερβολικά υψηλές θερμοκρασίες κατά το στάδιο αυτό, προκαλούν εγκαύματα στα φύλλα καθώς και ξήρανση, με αποτέλεσμα να δημιουργηθεί κιτρίνισμα και μαύρισμα, καθώς και καπνιστή γεύση. Οι υψηλές θερμοκρασίες, επίσης, υδρολύουν τις πρωτεΐνες του φύλλου.
- *την άλεση, μορφοποίηση και ξήρανση*: Κατά το τελευταίο στάδιο επεξεργασίας, τα φύλλα αλέθονται με σκοπό να διασπαστούν τα κυτταρικά τοιχώματα και έτσι, απελευθερώνεται η υγρασία τους και μορφοποιείται το τελικό προϊόν. Οι χρόνοι άλεσης ποικίλουν μεταξύ δέκα λεπτών και μίας ώρας. Τα νεαρά φύλλα, αλέθονται υπό ήπιες πιέσεις και για μικρότερο χρόνο, συγκριτικά με τα ώριμα φύλλα, με σκοπό να προληφθεί το σπάσιμο και το

κιτρίνισμα που προκύπτει, από την υδρόλυση της χλωροφύλλης και την αυτό-οξειδωση των πολυφαινολών. Τα αλεσμένα φύλλα τσάι, μορφοποιούνται σε διάφορους σχηματισμούς όπως, συστροφικά, στρογγυλά, επίπεδα, μυτερά, συμπιεσμένα και υπό μορφή πούδρας.

Τέλος, τα μορφοποιημένα φύλλα, ξηραίνονται με διάφορους μεθόδους όπως ξήρανση σε: τηγάνι, καλάθι, ήλιο ή ψήσιμο. Ανάλογα την μέθοδο, η ξήρανση λαμβάνει χώρα από είκοσι λεπτά μέχρι και όλη τη νύχτα. Η ξήρανση σε τηγάνι, παράγει ένα τσάι με μία σκληρή μορφή, όπου διατηρεί περισσότερο το άρωμα, συγκριτικά με το τσάι όπου ξηραίνεται στον αέρα, υπό το φως του ήλιου (**Εικόνα Α.1.3**).

Μετά την συγκομιδή, τα φύλλα τσάι επεξεργάζονται ταχέως, για να διαμορφωθεί η γεύση και να αποτραπεί η αποικοδόμηση των βιοχημικών ενώσεων και η επιμόλυνση.

Κατά μέσο όρο, τέσσερα στα έξι κιλά από το φρέσκο φύλλο τσάι, επεξεργάζονται, για να προκύψει τελικά ένα κιλό ξηρού φύλλου τσάι, το οποίο περιέχει 1.000 με 12.000 νέους βλαστούς.

Η καλλιέργεια, επεξεργασία και προετοιμασία του πράσινου τσάι, ως ειδικευμένη πρακτική και τέχνη, αναπτύχθηκε στην Κίνα, κατά την διάρκεια του 8^{ου} αιώνα από Βουδιστές μοναχούς, και έγινε γνωστή στο κοινό από έναν μοναχό, και συγκεκριμένα τον Lu Yu. Οι Βουδιστές μοναχοί, ήταν οι μεταδότες, όπου διέδιδαν την πρακτική της παραγωγής και κατανάλωσης του τσάι. Αυτοί, καλλιεργούσαν τα φυτά του τσάι μέσα, αλλά και γύρω από τους μοναστηριακούς κήπους, και στην συνέχεια, ύστερα από την συγκομιδή, τα επεξεργάζονταν (Carrie Gleason 2007; Ahmed et al. 2007).

Το πράσινο τσάι, καταναλώνονταν από τους ίδιους τους μοναχούς κατά την διάρκεια του διαλογισμού και χρησιμοποιούνταν σαν τονωτικό, για την διατήρηση της ευεξίας.

Η διαφοροποίηση σε διάφορα είδη τσάι επεκτάθηκε κατά την διάρκεια της δυναστείας Μινγκ (1368-1644), στην Κίνα, όταν οι παραγωγοί άρχισαν να πειραματίζονται με νέες μεθόδους τεχνικής.

Σήμερα, υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός ειδών πράσινου τσάι, που χαρακτηρίζονται από ένα εύρος μεθόδων καλλιέργειας και επεξεργασίας (Carrie Gleason 2007;

Ahmed et al. 2007).

Μια πρόσφατη μελέτη, ανέλυσε, τις αισθητήριες διαφορές που υπάρχουν μεταξύ ενός ευρέος φάσματος δειγμάτων πράσινου τσαί, με διαφορές, όσον αφορά την χώρα προέλευσης, την τιμή, την ποικιλία καθώς και τις μεθόδους παρασκευής. Τα αποτελέσματα, έδειξαν ότι το επεξεργασμένο, με ψήσιμο τσαί, ευθύνονταν για την αίσθηση “καμένου” στη γεύση, ενώ, η επεξεργασία του τσαί με ατμό, ευθύνονταν για την αίσθηση του “πράσινου” στη γεύση. Ακόμα, δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση της τιμής με την γεύση, καθώς, κάποια είδη ακριβών τσαί συγκαταλέχθηκαν στη ίδια ομάδα, με τα χαμηλής τιμής τσαί, όταν αυτά προέρχονταν από την ίδια χώρα ή κατασκευαστή, βάσει των χαρακτηριστικών που μελετήθηκαν(Lee et al. 2014).



Εικόνα A.1.3 Μέθοδοι ξήρανσης πράσινου τσαί. a) ξήρανση σε τηγάνι, b) ξήρανση σε καλάθι, c) ξήρανση στον ήλιο, d) ψήσιμο.

A.2 Επιπτώσεις του πράσινου τσαί στην Υγεία

Τις τελευταίες δεκαετίες, μεγάλος αριθμός μελετών, αναφέρει, τα πολλαπλά ευεργετικά οφέλη του πράσινου τσαί στην υγεία. Συνοπτικά, οι δράσεις του πράσινου τσαί που έχουν βρεθεί, είναι: αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές, αντικαρκινικές, αντιυπερτασικές, νευροπροστατευτικές, ικανότητα στη μείωση της χοληστερόλης και επαγωγή της θερμογένεσης. Κυρίως, το πολυφαινολικό περιεχόμενο του τσαί, κατέχει μια πληθώρα ευεργετικών αποτελεσμάτων στην υγεία, συμπεριλαμβανομένου της πρόληψης πολλών ασθενειών όπως ο καρκίνος, διαβήτης, αρθρίτιδα, καρδιαγγειακές νόσους, εγκεφαλικό και παχυσαρκία. (Hayat et al. 2013; C. S. Yang et al. 2014; Arts & Hollman 2005; Crichton et al. 2013; Higdon & Frei 2003; Zhang et al. 2014)

Η πρόσφατη ανασκόπηση, που πραγματοποίησε μία συστηματική ανάλυση στην εύρεση των στόχων του πολυφαινολικού περιεχομένου του πράσινου τσαί στον ανθρώπινο οργανισμό, συγκέντρωσε όλους τους 200 στόχους του πράσινου τσαί και τους κατηγοριοποίησε σε 6 ομάδες σύμφωνα με την σχετική ασθένεια που προκαλούν. Οι 6 ομάδες, περιλαμβάνουν τις εξής ασθένειες: καρκίνο, διαβήτη, νευροεκφυλιστικές, καρδιαγγειακές, μυϊκές και φλεγμονές. Επίσης, επιλέχθηκαν τα 20 πιθανά μονοπάτια που σχετίζονται με τις συγκεκριμένες ασθένειες. (Zhang et al. 2014) **(Εικόνα A.2.1)**

Η κατανάλωση τσαί φαίνεται να επηρεάζει το οξειδωτικό στρες, συγκεκριμένους βιοχημικούς παραμέτρους και την ενδοθηλιακή λειτουργία. Αυξημένη κατανάλωση (>10 κούπες την ημέρα), έχει φανεί να μειώνει τα επίπεδα τριγλυκεριδίων, καθώς και τις LDL, VLDL στον ορό του αίματος, ενώ αντίθετα, αυξάνει τα επίπεδα της HDL. (Khurana et al. 2013)

Αν και στις περισσότερες μελέτες, φαίνεται ότι πράσινο τσαί κατέχει έναν μεγάλο αριθμό ευεργετικών ιδιοτήτων, παρ'όλα αυτά, έχουν αναφερθεί αρκετές περιπτώσεις ηπατοτοξικότητας και νευροεκφυλιστικών διαταραχών, μετά την κατανάλωση μεγάλης ποσότητας ή συμπυκνωμένων παρασκευάσματος που προέρχονται από το φυτό *Camellia sinensis*. (Hayat et al. 2013; Kim et al. 2014)

A.2.1 Στοιχεία από Επιδημιολογικές μελέτες

Οι επιδημιολογικές μελέτες μέχρι και σήμερα δεν έχουν καταφέρει να δώσουν πληροφορίες όσον αφορά την σύναψη αιτιότητας μεταξύ του τσάι και την πρόληψη ή αντιμετώπιση ασθενειών. Ωστόσο, είναι χρήσιμες για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων στην ανθρώπινη υγεία, αφού προσφέρουν πληροφορίες για την κατανάλωση του τσάι, σε μεγάλο χρόνο και σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις πολυφαινολών.

Παρακάτω, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από διάφορες επιδημιολογικές μελέτες, όπου έχουν εξετάσει την επίδραση του τσάι ή του πολυφαινολικού περιεχομένου του, σε ανθρώπινο πληθυσμό, με κατηγοριοποίηση, ανά νόσο.

Καρκίνος

Σύμφωνα με το πρόσφατο κεφάλαιο (Forester & Lambert 2014) του βιβλίου "Polyphenols in Human Health and Disease" που εξετάζει την επίδραση των πολυφαινολών του τσάι στα διάφορα είδη καρκίνων από τις διάφορες μελέτες που έχουν διεξαχθεί, φαίνεται, τα στοιχεία να υποστηρίζουν τον προληπτικό ρόλο της κατανάλωσης τσάι. Τα κύρια είδη καρκίνου, που φαίνεται από τις μελέτες να μειώνεται ο κίνδυνος εμφάνισης, είναι: του μαστού (Rossi et al. n.d.), του στόματος, του οισοφάγου, των πνευμόνων, του προστάτη, του στομάχου, του παχέος εντέρου και του ορθού. (Forester & Lambert 2014)

Μια πρόσφατη μετα-ανάλυση (2014) (Wang et al. 2014), η οποία συμπεριέλαβε 38 μελέτες με θέμα τον καρκίνο των πνευμόνων (26 ασθενών-μαρτύρων και 12 κοορτής), με συνολικά 59,041 περιπτώσεις καρκίνου και 396,664 μάρτυρες, έδειξε, ότι, η κατανάλωση τσάι, συσχετίζεται σημαντικά με την μείωση του κινδύνου εμφάνισης του καρκίνου των πνευμόνων (RR: 0,78; 95% CI, 0,70–0,87). Η κατηγοριοποίηση σε υπο-ομάδες, έδειξε, το πράσινο τσάι να εμφανίζει αρνητική συσχέτιση με την εμφάνιση του καρκίνου των πνευμόνων (RR:0,75; 0,62–0,91). Ενώ οι μελέτες κοορτής δεν έδειξαν να υπάρχει σημαντική συσχέτιση, μεταξύ κατανάλωσης τσάι και εμφάνισης καρκίνου των πνευμόνων (RR:0,91, 95% CI, 0,77-1,08. (Zhang et al. 2014) (**Πίνακας A.2.1**).

Η συστηματική ανασκόπηση του 2013 (Fritz et al. 2012), η οποία εξέτασε τα δεδομένα για τον καρκίνο των πνευμόνων, αναφέρει ότι το πράσινο τσάι, αν και

φαίνεται να προσδίδει κάποια οφέλη στον ανθρώπινο οργανισμό, ακόμα, δεν υπάρχουν τα κατάλληλα στοιχεία τα οποία θα υποστηρίξουν μία θεραπεία ή ακόμα και την πρόληψη του συγκεκριμένου είδους καρκίνου ύστερα από την κατανάλωση τσαί.

Καρδιαγγειακά

Η μελέτη ανασκόπησης των Iija CW Arts et al.(Arts & Hollman 2005), συμπεριέλαβε 12 μελέτες κοορτής όσον αφορά τα Φλαβονοειδή και τον κίνδυνο εμφάνισης της στεφανιαίας νόσου (CAD) και 5 μελέτες κοορτής όσον αφορά τον κίνδυνο εμφάνισης εγκεφαλικού. Οι 7 προοπτικές μελέτες, έδειξαν, ένα προστατευτικό αποτέλεσμα των φλαβονολών και φλαβονων ή κατεχινών, σε σχέση με τον θάνατο, ή μη, από CAD και μείωση του κινδύνου θνησιμότητας πάνω από 65%. Από τις 5 μελέτες που εξέτασαν τα φλαβονοειδή στο αποτέλεσμα του εγκεφαλικού, οι 2, βρήκαν να υπάρχει αρνητική συσχέτιση, ενώ βρέθηκε προστατευτικό αποτέλεσμα κυρίως για τις φλαβονόλες και φλαβόνες, αλλά όχι για τις κατεχίνες.

Η πιο πρόσφατη μετα-ανάλυση (2011), των Ze-Mu Wang et. al(Wang et al. 2011), με διαθέσιμα περιορισμένα δεδομένα για το πράσινο τσαί, έδειξε μία ενδεικτική συσχέτιση της κατανάλωσης πράσινου τσαί και την μείωση του κινδύνου CAD. Η μετα-ανάλυση αυτή συμπεριέλαβε, συνολικά 18 μελέτες, εκ των οποίων οι 5 αναφέρονταν στο πράσινο τσαί. Για το πράσινο τσαί, μία σύνοψη των RR, έδειξε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της υψηλής κατανάλωσης πράσινου τσαί και την μείωση του κινδύνου CAD (RR: 0,72; 95% CI: 0,58-0,89). **(Εικόνα A.2.2)**

Διαβήτης

Η διαθέσιμη βιβλιογραφία, όσον αφορά την δράση του πράσινου τσαί στην εξάλειψη του διαβήτη τύπου 2, δείχνει μία θετική συσχέτιση. Παρόλα αυτά οι μελέτες έχουν διεξαχθεί in vitro σε κυτταρικές καλλιέργειες και in vivo κυρίως σε ποντίκια, διότι είναι δύσκολο στον άνθρωπο να αποδειχθεί το αποτέλεσμα μείωσης της γλυκόζης. Οι μεμονωμένες μελέτες, και πιο αξιόπιστα, οι μετα-αναλύσεις μεγάλων κοορτής μελετών, δείχνουν να υπάρχει ένα δόσο-εξαρτώμενο αποτέλεσμα που σχετίζεται με την ποσότητα κατανάλωσης του τσαί. Κλινικά σημαντικό θετικό αποτέλεσμα, φαίνεται να υπάρχει, όταν η κατανάλωση τσαί είναι μεγαλύτερη από 4 φλιτζάνια την ημέρα.(Grant & Dworakowska 2013)

Η πρόσφατη μετα-ανάλυση (2014), μελέτησε την συσχέτιση της καθημερινής κατανάλωσης του τσάι (≥ 3 φλιτζάνια/ημέρα), με την μείωση του κινδύνου εμφάνισης διαβήτη τύπου 2 (J. Yang et al. 2014). Οι μελέτες που συμπεριλήφθηκαν στην μετα-ανάλυση αυτή, ήταν κοορτής και διεξήχθησαν 6 στην Αμερική, 3 στην Ασία και 3 στην Ευρώπη, με συνολικό πληθυσμό 761.949 και 29.981 νέα περιστατικά διαβήτη τύπου 2. Η μέση ηλικία των εθελοντών είχε εύρος 17-88, και η διάρκεια 3-18 χρόνια. Τα αποτελέσματα, του συνόλου, δεν έδειξαν σημαντική στατιστική συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης του τσάι και του κινδύνου εμφάνισης T2DM (RR:0,99, 95%CI:0,95-1,03). Η στρωματοποιημένη ανάλυση, που σύγκρινε την ομάδα μικρότερης/καθόλου κατανάλωσης τσάι, με την ομάδα καθημερινής κατανάλωσης (≥ 3 φλιτζάνια/ημέρα), δείχνει, να μειώνεται ο κίνδυνος εμφάνισης του T2DM (RR: 0,84, 95% CI:0,73-0,97). **(Εικόνα A.2.3)**

Η συνολική στρωματοποιημένη ανάλυση όσον αφορά την εθνικότητα, έδειξε, για τους Ασιάτες το RR:0,84 με τυπική απόκλιση 0,71-1,00 και RR: 1,00 με τυπική απόκλιση 0,97-1,04 για τους Αμερικάνους και Ευρωπαίους. **(Εικόνα A.2.4)**

Ένας περιορισμός της μετα-ανάλυσης αυτής, υπήρξε το είδος του τσάι που εξετάστηκε σε κάθε μελέτη, διότι, δεν υπήρχε δυνατότητα στρωματοποίησης του είδους και της συσχέτισης με τον κίνδυνο εμφάνισης του T2DM. (J. Yang et al. 2014)

Σε αντίθεση με τα παραπάνω, μία προηγούμενη μετα-ανάλυση (2013), που ανέλυσε την επίδραση, συγκεκριμένα του πράσινου τσάι ή εκχυλίσματα αυτού, σε συγκεκριμένους δείκτες, έδειξε να μην υπάρχει σημαντική μείωση των επιπέδων της μεταγευματικής γλυκόζης του πλάσματος και ορού, καθώς και της OGTT-2h γλυκόζης, αιμογλοβίνη A1c and HOMAIR, σε πληθυσμό με κίνδυνο εμφάνισης T2DM. Η μετα-ανάλυση αυτή, συμπεριέλαβε 7 τυχαιοποιημένες μελέτες με 150 συμμετέχοντες και διάρκειας 2-4 μηνών, που σύγκριναν διαφορετικές δόσεις του πράσινου τσάι. (Wang et al. 2013)

Παχυσαρκία

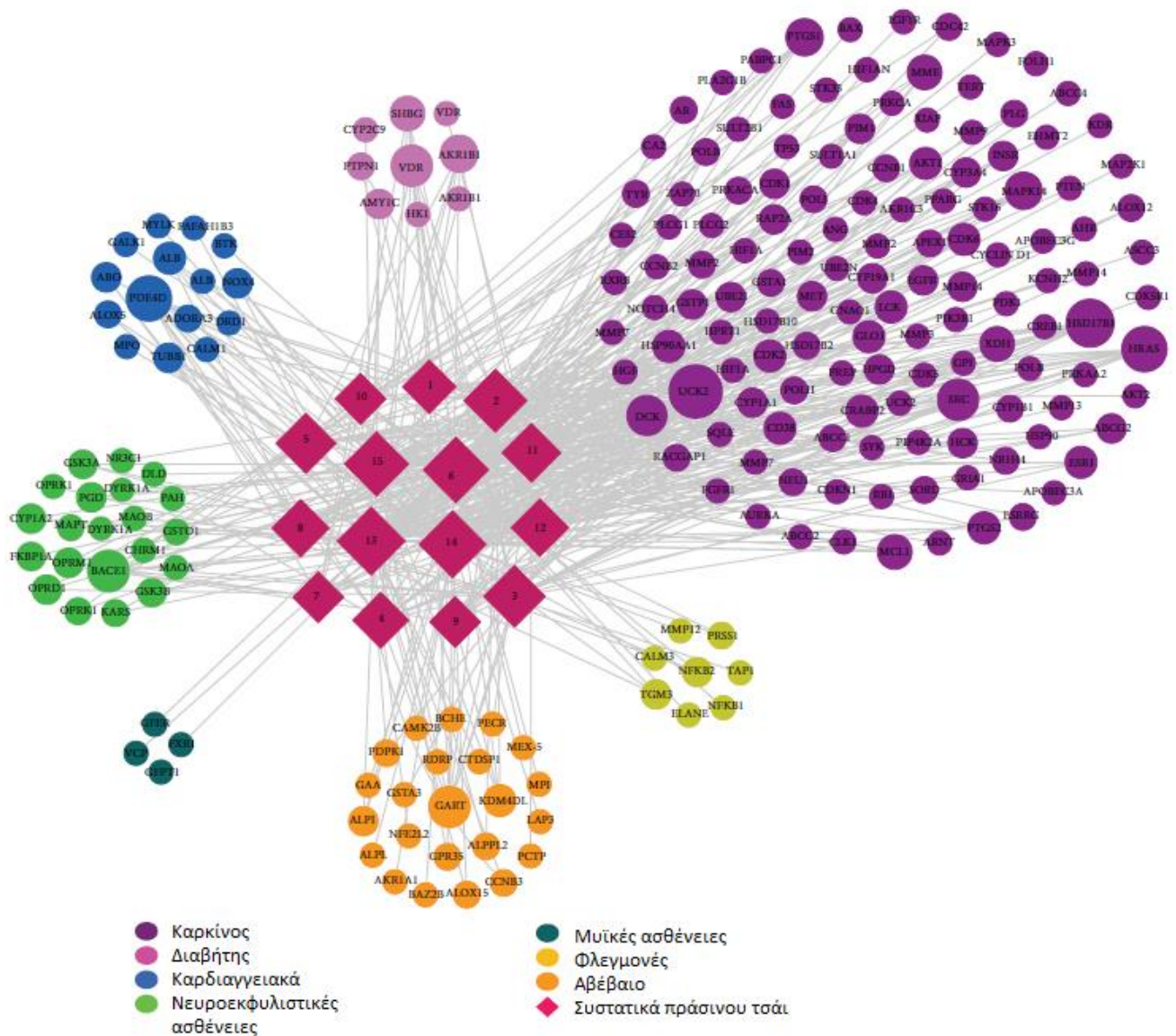
Στην κινέζικη παράδοση λέγεται ότι το πράσινο τσάι ξεπλένει το λίπος. Η αρχαία αυτή άποψη επιβεβαιώνεται μέχρι και σήμερα με μελέτες που έχουν διεξαχθεί τόσο στον ανατολικό όσο και στον δυτικό πληθυσμό.

Η πρόσφατη μελέτη ανασκόπησης (Huang et al. 2014), συνοψίζει τα αποτελέσματα

μελετών με εύρος διάρκειας 6 – 24 εβδομάδες και τσάι με περιεχόμενο ποσοστό σε κατεχίνες, 140,8 με 1500 mg την ημέρα. Οι περισσότερες δοκιμές που εξετάστηκαν, περιελάμβαναν δόση ίση με 3-4 κούπες πράσινου τσάι την ημέρα, σε διάρκεια 12 εβδομάδων. Τα αποτελέσματα έδειξαν, 5 από τις 11 δοκιμές να παρουσιάζουν σημαντική μείωση του βάρους (εύρος 1,0 με 2,0 kg) στον πληθυσμό της ανατολής. Παρόλα αυτά, στο δυτικό πληθυσμό αξιοσημείωτη μείωση στα κιλά (εύρος 1 με 9 kg) παρατηρήθηκε μόνο σε 3 από τις 13 μελέτες που εξετάστηκαν. Η διαφορά αυτή, μεταξύ του δυτικού και ανατολικού πληθυσμού, πιθανός να εξηγείτε, από τον διαφορετικό τρόπο ζωής (διατροφικές συνήθειες και άσκηση) ή ακόμα και από την διαφορετική διεξαγωγή των πειραμάτων (η ομάδα ελέγχου στον ανατολικό πληθυσμό κατανάλωνε ρόφημα μικρής συγκέντρωσης σε κατεχίνες και συγκεκριμένη δόση σε καφεΐνη, ενώ στον δυτικό πληθυσμό, κατανάλωνε μία εικονική δόση).

Η μελέτη των εκχυλισμάτων του πράσινου τσάι δείχνει να αυξάνει η οξειδωση του λίπους καθώς και η κατανάλωση ενέργειας, συγκεκριμένα, εάν συνδυάζεται με μεταβολικούς ενεργοποιητές, όπως η καφεΐνη, καθώς, φαίνεται να υπάρχει ένα συνεργιστικό αποτέλεσμα συγκεκριμένα με την κατεχίνη EGCG. (Huang et al. 2014; Westerterp-Plantenga 2010)

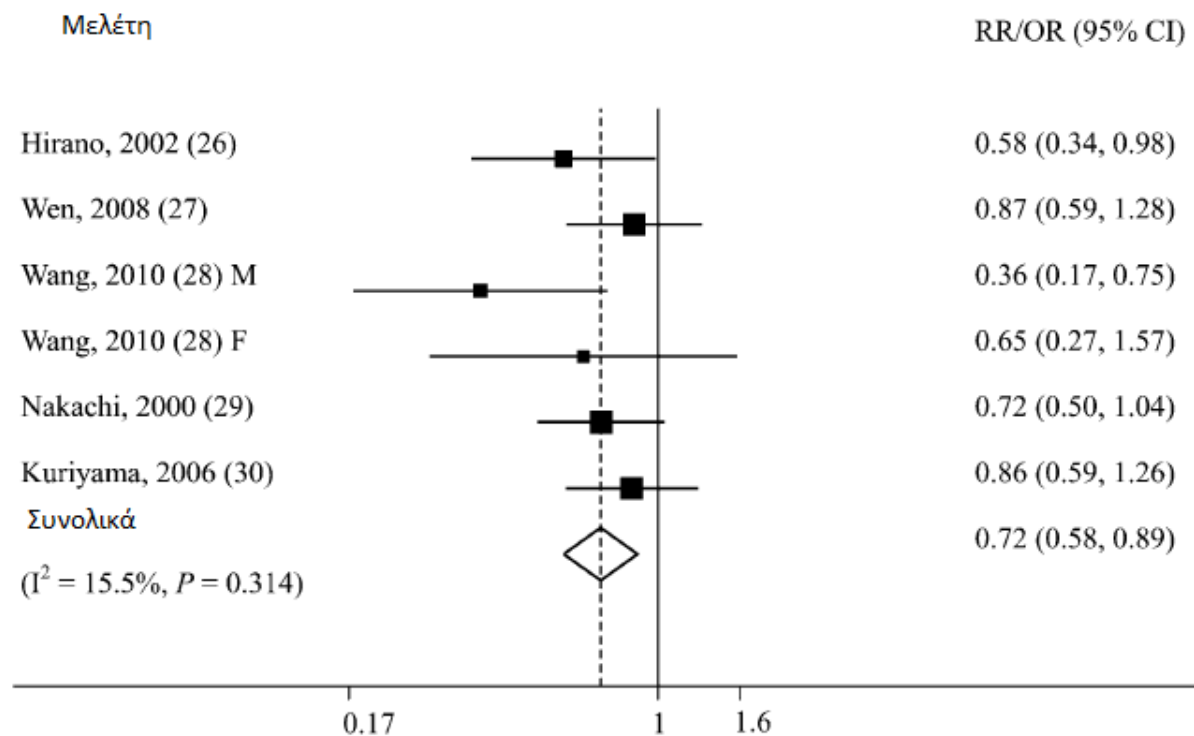
Το συνεργιστικό αυτό φαινόμενο, μελετήθηκε νωρίτερα από την μετα-ανάλυση των Hursel et al (Hursel et al. 2009), έτσι ώστε να βρεθεί η επίδραση του μίγματος EGCG-καφεΐνης στο σωματικό βάρος. Τα αποτελέσματα έδειξαν, ότι το μίγμα αυτό, έχει αποτέλεσμα στη μείωση του βάρους και διατήρηση του, ύστερα από μία περίοδο αρνητικού ενεργειακού ισοζυγίου. Επίσης, φάνηκε να επηρεάζει το αποτέλεσμα, η εθνικότητα καθώς και η συνήθης πρόσληψη καφεΐνης, ενώ η ομάδα ελέγχου δεν επηρέαζε το αποτέλεσμα. Τέλος, η μετα-ανάλυση αυτή, έδειξε, ότι οι διαφορές στη δόση του μίγματος EGCG-καφεΐνης, μεταξύ της ομάδας ελέγχου και παρέμβασης, δεν είχαν καμία επίδραση στο μέγεθος του αποτελέσματος. Το μοντέλο τυχαιοποίησης που χρησιμοποιήθηκε, έδειξε, ένα μέτριο αλλά σημαντικά θετικό αποτέλεσμα των κατεχινών στην μείωση και διατήρηση του βάρους (μέση μεταβολή του σωματικού βάρους ανάμεσα στην ομάδα παρέμβασης και στην ομάδα ελέγχου, $\hat{\mu} = 1,31$, 95% CI: 2,05-0,57). (Hursel et al. 2009) (**Εικόνα A.2.5**)



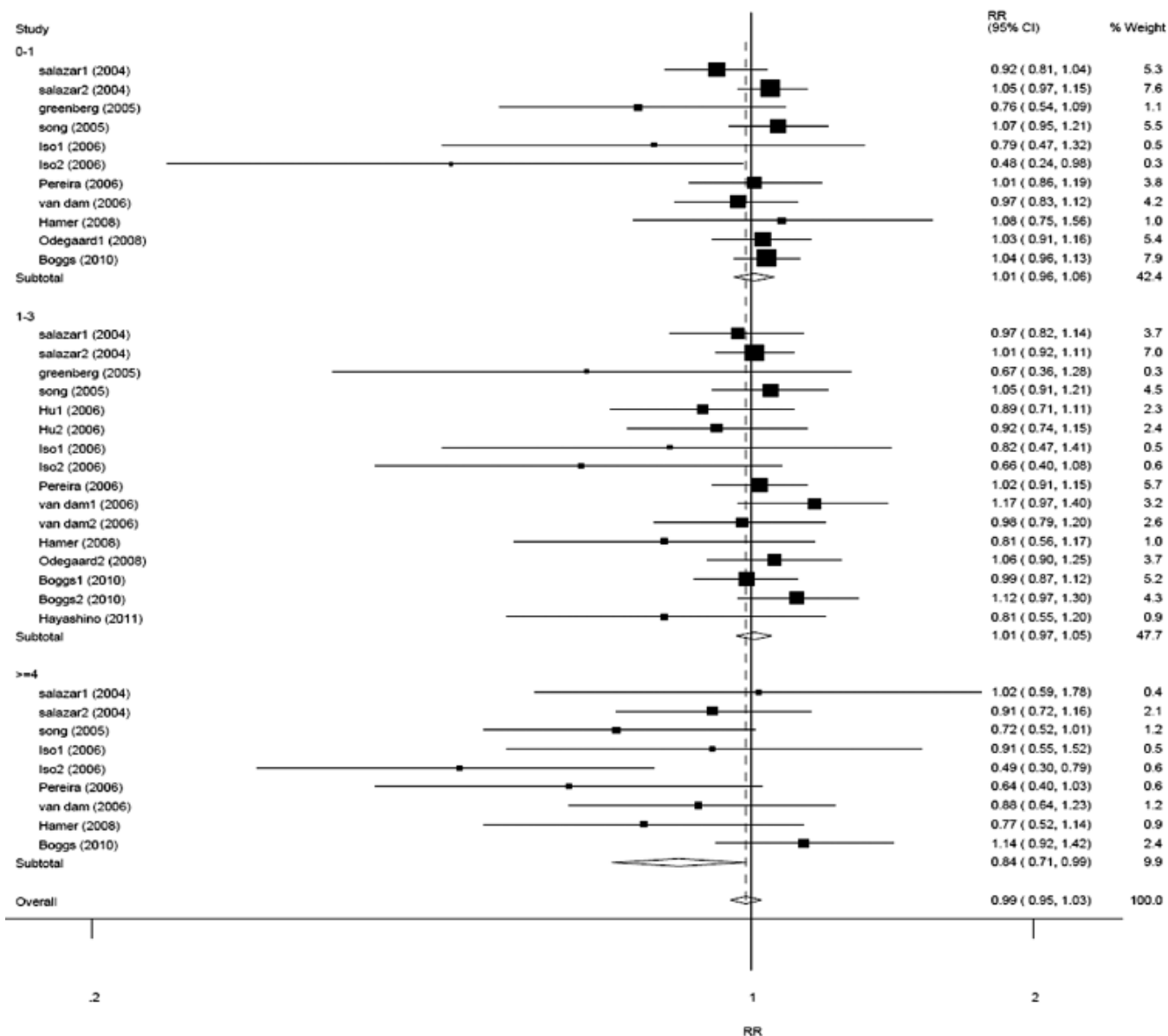
Εικόνα Α.2.1 Κατηγοριοποίηση σε 7 ομάδες, των σχετικών ασθενειών, που προκύπτουν, από τα διακόσια σημεία του ανθρώπινου οργανισμού, στα οποία, στοχεύουν οι πολυφαινόλες του πράσινου τσαί. Οι κύκλοι, αντιπροσωπεύουν τους στόχους και οι ρόμβοι τις πολυφαινόλες του πράσινου τσαί. (Zhang et al. 2014)

Είδος Μελετών	Αριθμός Μελετών	RR(95%CI)	Τεστ ετερογένειας	
			Τιμή P	I (%)
Σχεδιασμός Μελέτης				
Προοπτικές	12	0,91(0,77-1,08)	<0,001	78,2
Ασθενών-Μαρτύρων	26	0,72(0,63-0,83)	<0,001	82,5
Είδος Τσαί				
Πράσινο	16	0,75(0,62-0,91)	<0,001	73,4
Μαύρο	13	0,82(0,71-0,94)	<0,001	87,8

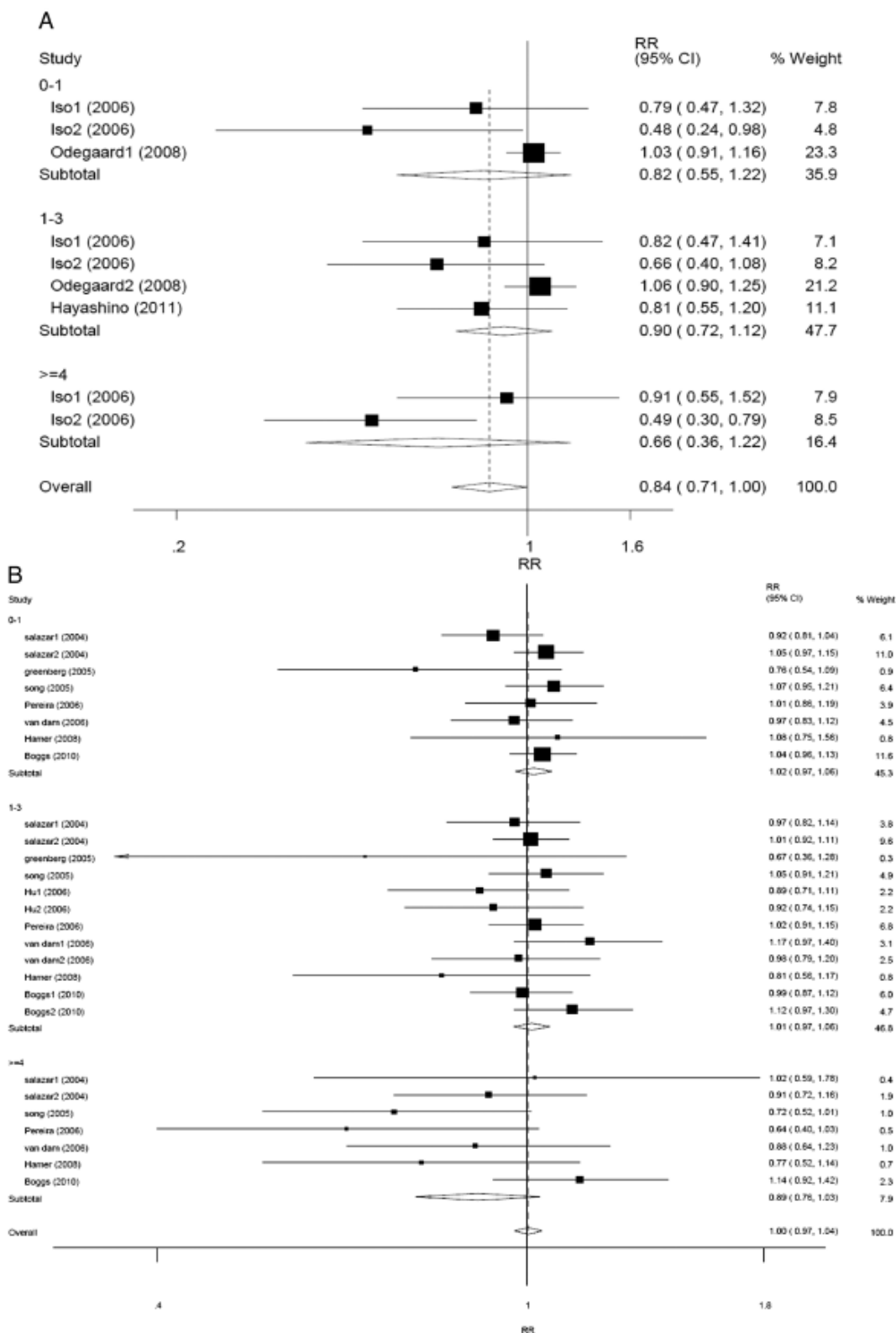
Πίνακας Α.2.1 Ανάλυση σε υποκατηγορίες της μετα-ανάλυσης, ανάμεσα στην κατανάλωση τσαί και τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των πνευμόνων.(Wang et al. 2014)



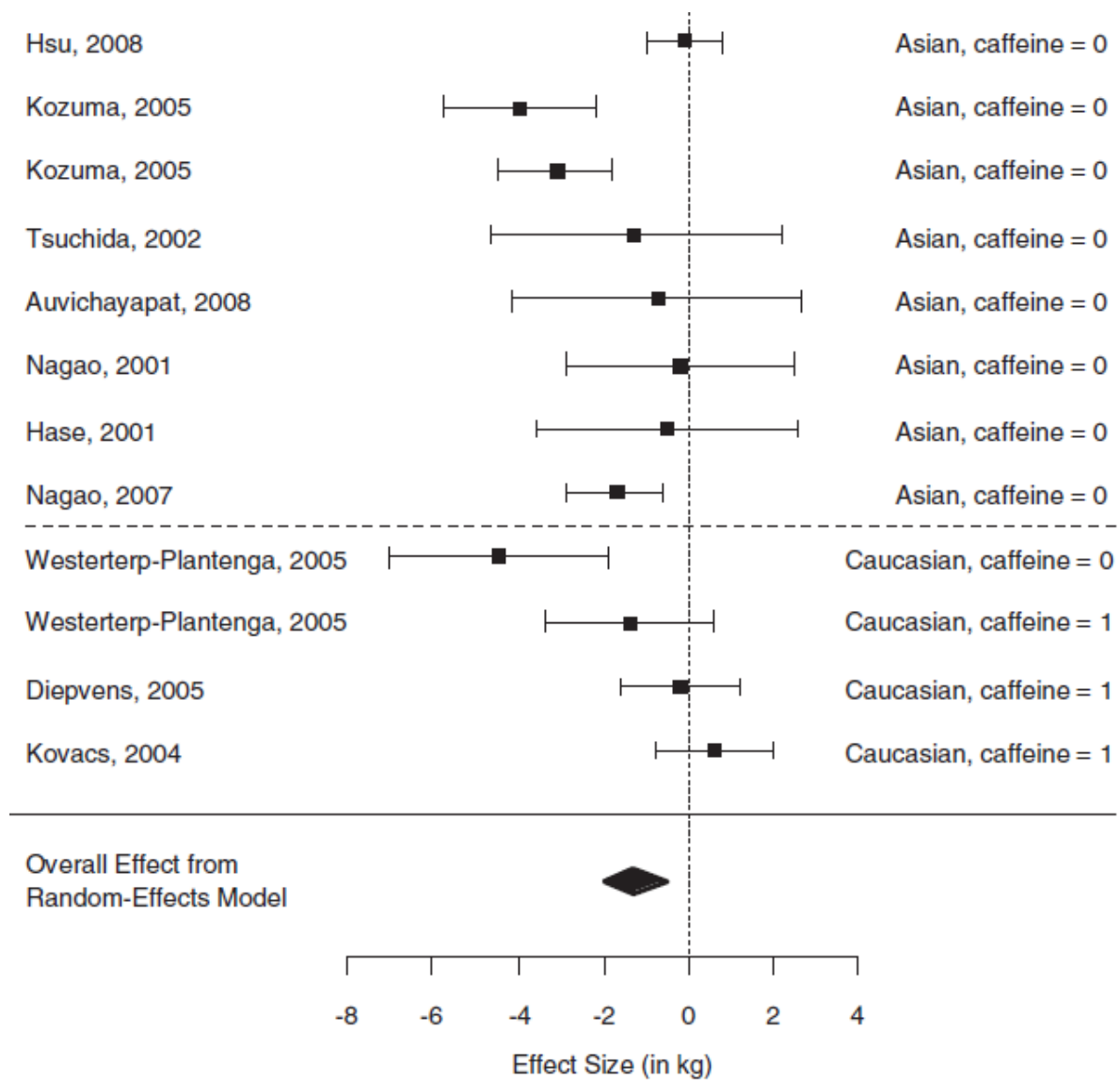
Εικόνα Α.2.2 Σύνοψη του σχετικού κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίας νόσου. Τα τετράγωνα υποδηλώνουν το σχετικό κίνδυνο κάθε μελέτης και το μέγεθός τους, αντικατοπτρίζουν το στατιστικό βάρος. Ο ρόμβος, υποδηλώνει την σύνοψη των σχετικών κινδύνων. Η εκτίμηση του υπολογισμού RR κάθε μελέτης συνδυάστηκε με την χρήση δύο μοντέλων (Der Simonian και Laird).(Wang et al. 2011)



Εικόνα A.2.3 Σύνοψη του σχετικού κινδύνου εμφάνισης T2DM που σχετίζεται με την κατανάλωση τσάι, σύμφωνα με την συχνότητα κατανάλωσης. 0–1, 1–3 και ≥4 φλιτζάνια/ημέρα. Καθόλου/ελάχιστη κατανάλωση αναφέρεται ως ομάδα αναφοράς. Τα τετράγωνα υποδηλώνουν το σχετικό κίνδυνο κάθε μελέτης και το μέγεθός τους, αντικατοπτρίζουν το στατιστικό βάρος. Ο ρόμβος, υποδηλώνει την σύνοψη των σχετικών κινδύνων. Η εκτίμηση του υπολογισμού RR πραγματοποιείται σε διάστημα εμπιστοσύνης 95%.(J. Yang et al. 2014)



Εικόνα Α.2.4 Σύνοψη του σχετικού κινδύνου εμφάνισης T2DM που σχετίζεται με την κατανάλωση τσάι, σύμφωνα με την συχνότητα κατανάλωσης. 0–1, 1–3 και ≥4 φλιτζάνια/ημέρα. Καθόλου/ελάχιστη κατανάλωση αναφέρεται ως ομάδα αναφοράς. Α) σε Ασιατικό πληθυσμό, Β) σε Αμερικάνικο και Ευρωπαϊκό πληθυσμό. Τα τετράγωνα υποδηλώνουν το σχετικό κίνδυνο κάθε μελέτης και το μέγεθός τους, αντικατοπτρίζουν το στατιστικό βάρος. Ο ρόμβος, υποδηλώνει την σύνοψη των σχετικών κινδύνων. Η εκτίμηση του υπολογισμού RR πραγματοποιείται σε διάστημα εμπιστοσύνης 95%. (J. Yang et al. 2014)



Εικόνα A.2.5 Forest-plot μέσης μεταβολής του σωματικού βάρους ανάμεσα στην ομάδα παρέμβασης και της ομάδας ελέγχου, μ, σε διάστημα εμπιστοσύνης 95%. (καφεΐνη: 0 / 1 για χαμηλή (0) ή μέτρια έως υψηλή (1) τακτική πρόσληψη καφεΐνης). (Hursel et al. 2009)

A.3 Χημικά-Βιοχημικά Χαρακτηριστικά του πράσινου τσαί

Τα είδη που προέρχονται από το γένος *Camellia* χαρακτηρίζονται από διαφορετικό χημικό προφίλ. Το τσαί έχει αποδειχτεί ότι περιέχει χαρακτηριστικές ενώσεις, όπως, καφεΐνη, κατεχίνες και θειανίνη. Παρόλα αυτά, από όλα τα είδη του γένους *Camellia*, μόνο τα είδη από το τμήμα του *Thea*, περιέχουν γαλλικές κατεχίνες, όπως, γαλλική επικατεχίνη (ECG), γαλλική επιγαλλοκατεχίνη (EGCG) και το μη πρωτεϊνικό αμινοξύ, θειανίνη (Wachira et al. 2013). Από τα παραπάνω, η EGCG είναι η περισσότερο ευρέως μελετημένη ένωση του πράσινου τσαί, με τους περισσότερους ισχυρισμούς υγείας από όλες τις ενώσεις του τσαί.

Η καφεΐνη, ένα αλκαλοειδές ξανθίνης, συνεισφέρει στις ενεργοποιητικές ιδιότητες του πράσινου τσαί, ενώ η θειανίνη (N-αίθυλο-L-γλουταμίνη), ένα αμινοξύ και ανάλογο του γλουταμινικού οξέος, συνεισφέρει στις χαλαρωτικές ιδιότητες. Η καφεΐνη και θειανίνη, έχουν ένα συνεργιστικό, φυσιολογικό αποτέλεσμα στην ενίσχυση της νοητικής εγρήγορσης.

Οι κατεχίνες και η καφεΐνη είναι δευτερογενείς μεταβολίτες, όπου λειτουργούν ως ενώσεις υπεράσπισης των φυτών. Οι ενώσεις αυτές προσδίδουν στα φυτά μια αντίσταση στα παθογόνα και αρπακτικά, μειώνουν το οξειδωτικό στρες και προστατεύουν από άλλες περιβαλλοντικές μεταβλητές. Τα ποσά που βρίσκονται στα φυτά ποικίλουν ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες, καθώς και με τις μεθόδους επεξεργασίας που ακολουθούνται. Το συνολικό περιεχόμενο σε κατεχίνη μπορεί να ποικίλει στα διάφορα είδη πράσινου τσαί περισσότερο από 10 φορές, από 21,38 με 228,20 mg/g ξηρού φυτού από υδατικά εκχυλίσματα.

Το περιεχόμενο σε κατεχίνες, μπορεί εύκολα να επηρεαστεί κατά τα διάφορα στάδια επεξεργασίας. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση σε κατεχίνες βρίσκεται στα φρέσκα φύλλα, αλλά καθώς αυτά θερμαίνονται, αλέθονται και ξηραίνονται κατά την επεξεργασία, η συγκέντρωσή τους μειώνεται λόγω των οξειδώσεων, υδρολύσεων, πολυμερισμού και μετατροπών που υφίστανται. Οι βιοχημικές αλλαγές, κατά την διάρκεια της επεξεργασίας, έχουν ως αποτέλεσμα σε ένα προϊόν τσαί με τουλάχιστον 15% λιγότερο ποσοστό σε πολυφαινόλες σε σχέση με τα φρέσκα φύλλα. Αντίθετα, η καφεΐνη, είναι λιγότερο ευαίσθητη στη θέρμανση και δεν μειώνεται σημαντικά το ποσοστό της κατά την επεξεργασία. Παρόλα αυτά, η επεξεργασία του τσαί είναι ωφέλιμη για την σταθεροποίηση και αύξηση της ζωής

των κατεχινών, αφού απενεργοποιούνται τα ένζυμα που ευθύνονται για την οξειδωση αυτών.

Πολλές πρωτεΐνες διασπώνται στα αμινοξέα τους λόγω υψηλής θερμοκρασίας και υγρασίας. Τα αμινοξέα είναι σημαντικά πρόδρομα μόρια των αρωμάτων του τσαί, κάποια εκ των οποίων μετατρέπονται σε πτητικές αρωματικές ουσίες κατά την επεξεργασία του πράσινου τσαί. Ως αποτέλεσμα των παραπάνω, μόνο ένα ελάχιστο ποσοστό αρωματικών ενώσεων βρίσκονται στα φρέσκα φύλλα συγκριτικά με τον αριθμό των 600 αρωματικών ενώσεων που βρίσκονται στο τσαί ύστερα από την επεξεργασία. Ανάλογα το είδος του τσαί, αλλάζει και το ποσοστό σε αμινοξέα. Για παράδειγμα, το μαύρο τσαί, περιέχει από τα μικρότερα ποσοστά σε θειανίνη συγκριτικά με τα άλλα είδη τσαί, λόγω της επεξεργασίας του, αφού εφαρμόζονται υψηλές θερμοκρασίες.

Όπως και με τα αμινοξέα, έτσι και τα επίπεδα των υδατοδιαλυτών υδατανθράκων επίσης αυξάνονται κατά την επεξεργασία, λόγω των ίδιων παραγόντων (θερμοκρασία και υγρασία).

Η χλωροφύλλη, η κύρια χρωστική των φρέσκων φύλλων, κατά την επεξεργασία ξήρανσης μειώνεται περίπου στο μισό, λόγω αυξημένης θερμοκρασίας, αλλαγές του pH και της υδρόλυσης (Ahmed et al. 2007).

A.3.1 Χαρακτηριστικά Κατεχινών

Οι κατεχίνες, είναι η κύρια ομάδα φλαβονοειδών (φλαβαν-3-όλες), που υπάρχουν στο τσαί, σε ποσοστό περίπου 6-16%. Τα μόρια τους, μπορούν να συνδεθούν με υποκαταστάτες γαλλικού οξέος, σχηματίζοντας παράγωγα, υπεύθυνα για τους διάφορους ισχυρισμούς υγείας του πράσινου τσαί, συμπεριλαμβανομένου των αντιοξειδωτικών και αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων τους.

Η ονομασία τους προέκυψε από το "κατεχού", όνομα του εκχυλίσματος από το φυτό *Acacia catechu* L. Fabaceae, που βρέθηκε στην Ασία.

Οι κύριες κατεχίνες στο τσαί είναι η επικατεχίνη (EC), σε ποσοστό περίπου 6,4%, η επιγαλλοκατεχίνη (EGC), σε ποσοστό περίπου 19%, η γαλλική επικατεχίνη-3 (ECG), σε ποσοστό περίπου 13,6% και η γαλλική επιγαλλοκατεχίνη-3 (EGCG), σε ποσοστό περίπου 59% (**EIKONA A.3.1**)(Engelhardt 2013; Persson 2013; Hayat et al. 2013).

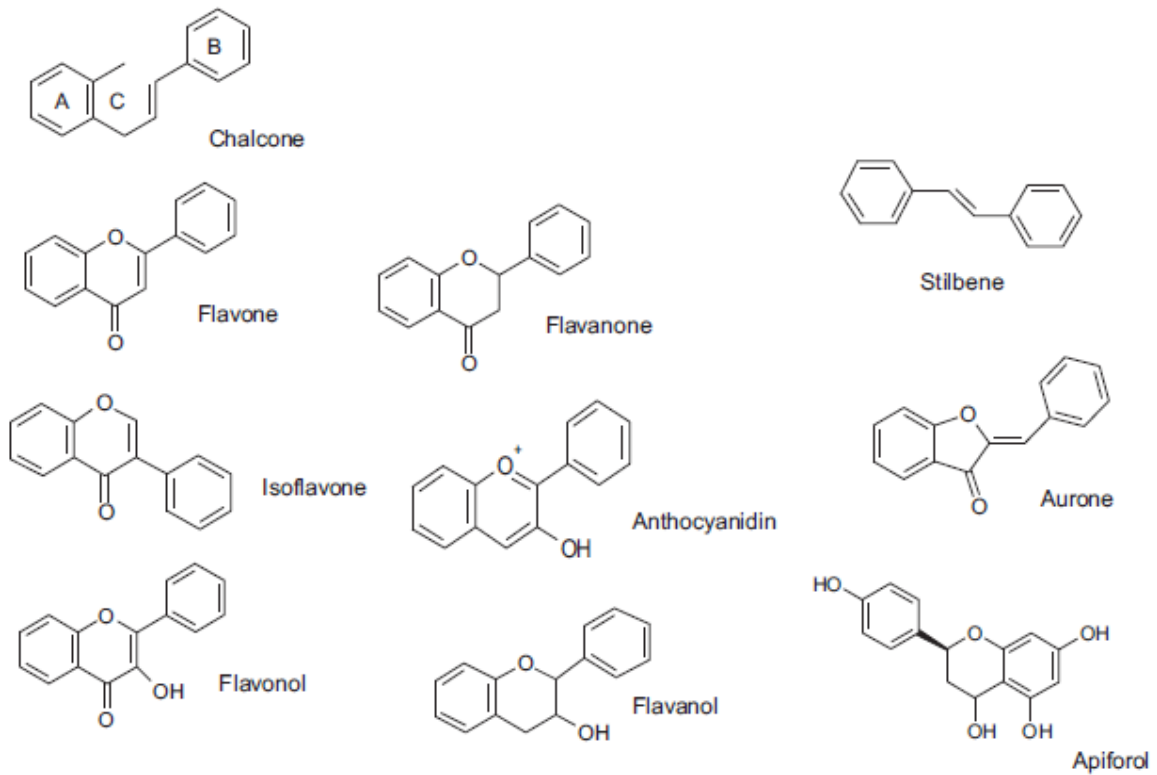
Οι φλαβανόλες ανήκουν στην μεγαλύτερη κατηγορία των φαινολικών ενώσεων στα φυτά, τα φλαβονοειδή. Τα φλαβονοειδή είναι υδατοδιαλυτές χρωστικές που υπάρχουν στο κυτταρόλυμα και/η αποθηκεύονται στο κενοτόπιο του φυτικού κυττάρου (Persson 2013; Ahmed et al. 2007).

Το μονοπάτι της βιοσύνθεσης των φλαβονοειδών, είναι ένα κομμάτι του μεγαλύτερου φαινυλοπροπανοειδούς μονοπατιού και είναι το περισσότερο μελετημένο μονοπάτι και γνωστό για τους δευτερογενείς μεταβολίτες του. Τα παράγωγα του μονοπατιού αυτού είναι τα φαινολικά οξέα (ουσίες που περιλαμβάνουν ένα αρωματικό δακτύλιο, C_6H_5 , και ένα οργανικό καρβοξυλικό οξύ, που περιέχει τουλάχιστον μία καρβοξυλική ομάδα-COOH). Τα φαινολικά αυτά οξέα, λειτουργούν στη συνέχεια ως πρόδρομα μόρια για την σύνθεση των φλαβονοειδών (C6-C3-C6), στυλβενίων (C6-C2-C6), ορονών (ετεροκυκλικές ενώσεις) και αποφορολών (φλαβαν-4-ολες).

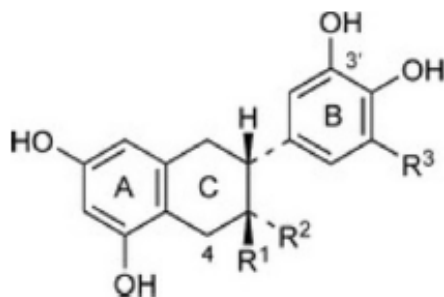
Τα φλαβονοειδή, προκύπτουν από τον συνδυασμό των δύο μεταβολικών μονοπατιών, σικιμικού και μεβαλονικού οξέος.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η βασική δομή των φλαβονοειδών βασίζεται σε δύο ανθρακικούς δακτυλίους, που συνδέονται από τρία άτομα άνθρακα (C6-C3-C6), γνωστή και ως δομή χαλκόνης, η οποία είναι ασταθής. Ο δακτύλιος B, καθώς και η γέφυρα με τα τρία άτομα άνθρακα, προέρχονται από το μονοπάτι του σικιμικού οξέος, μέσω της φαινυλαλανίνης και του π-κουμαρικού οξέος. Ο δακτύλιος A, είναι παράγωγο του μονοπατιού του μαλονικού οξέος. Το ένζυμο κλειδί για τον σχηματισμό του μορίου χαλκόνης, είναι η συνθετάση της χαλκόνης (CHS).

Οι κύριες ομάδες των φλαβονοειδών, χωρίζονται σε χαλκόνες, φλαβανόνες, φλαβόνες, φλαβονόλες, ισοφλαβόνες, ανθοκυανιδίνες και φλαβανόλες, σύμφωνα με τις διαφορές στο ανθρακικό δακτύλιο, στους υποκαταστάτες υδροξυλίου και τους διπλούς δεσμούς (**EIKONA A.3.2**)(Persson 2013).



Εικόνα Α.3.1 Χημικές δομές των κύριων κατηγοριών φλαβονοειδών(Persson 2013).



Εικόνα Α.3.2 Δομές των κατεχινών (φλαβαν-3-ολς) από το τσai, (-) γαλλική επιγαλλοκατεχίνη: $R^1=H$, $R^2=$ γαλλικός υποκαταστάτης, $R^3=OH$; (-) επιγαλλοκατεχίνη: R^1OH , $R^2=OH$, $R^3=OH$; (-) γαλλική επικατεχίνη: $R^1=R^3=H$, $R^2=$ γαλλικός υποκαταστάτης; (+)γαλλοκατεχίνη $R^1=R^3=OH$, $R^2=H$; (-)επικατεχίνη: $R^1=R^3=H$, $R^2=OH$; (+)κατεχίνη: $R^1=OH$, $R^2=R^3=H$.(Engelhardt 2013)

A.3.2 Δράσεις Κατεχινών

Οι περισσότερες ευεργετικές ιδιότητες του πράσινου τσαγιού, οφείλονται στην δράση του πολυφαινολικού του περιεχομένου και συγκεκριμένα στις κατεχίνες.

Έρευνες, αναφέρουν ότι η ομάδα του γαλλικού οξέος που βρίσκεται στις κατεχίνες του πράσινου τσαγιού, ευθύνεται κυρίως, για τις συγκεκριμένες λειτουργίες αυτών. Η κατεχίνη που βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία στο πράσινο τσάι είναι η γαλλική επιγαλλοκατεχίνη (EGCG), όπου στη χημική δομή της περιλαμβάνεται το τμήμα του γαλλικού και όπως έχει φανεί από μελέτες σε ζώα, κλινικές μελέτες καθώς και σε καλλιέργειες κυττάρων, είναι η κύρια υπεύθυνη για τις ωφέλιμες ιδιότητες του πράσινου τσαγιού (Kim et al. 2014).

Παρακάτω, αναλύονται οι κύριοι μηχανισμοί δράσης των κατεχινών του πράσινου τσαγιού, που ευθύνονται για τις ευεργετικές λειτουργίες του στην υγεία (βλέπε υποενότητα A.2.1), όπως έχουν εξηγηθεί από τις διάφορες μελέτες.

Αντιοξειδωτική δράση και πρόληψη του οξειδωτικού στρες

Η βιβλιογραφία, με αρκετές αναφορές, αναφέρει την αντιοξειδωτική δράση των κατεχινών ως την κύρια ευεργετική λειτουργία για την υγεία, με την προαγωγή σημαντικών αντιτοξικών ενζύμων.

Ως αντιοξειδωτικά, χαρακτηρίζονται οι ενώσεις, οι οποίες, αναστέλλουν ή καθυστερούν την οξείδωση των άλλων κυτταρικών μορίων, όπως, πρωτεΐνες, φωσφολιπίδια και το DNA. Οι μηχανισμοί που έχουν προταθεί όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση που παρατηρείται σε περίπτωση οξειδωτικού στρες, ποικίλουν. Οι μηχανισμοί αυτοί, περιλαμβάνουν: την άμεση εξουδετέρωση των ριζών ROS, την αναστολή της δημιουργίας των ROS, την αύξηση της έκφρασης των γονιδίων Bcl-2, και την αύξηση της παραγωγής των ενδογενών αντιοξειδωτικών.

Τα ενδογενή αντιοξειδωτικά που περιλαμβάνει το κύτταρο, είναι, η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), η ανηγμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSH) και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx).

Το πιο σημαντικό ενδογενές αντιοξειδωτικό αποτελεί η GSH, η οποία είναι ικανή να εξουδετερώνει ρίζες υδροξυλίου όπως και ρίζες σουπεροξειδίου. Οι υπεροξειδάσες GSH, αποτελούν σημαντικά μόρια, στην άμυνα του κυττάρου από το τοξικό

αποτέλεσμα του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Παρουσία της GSH, η GPx λειτουργεί σαν καταλύτης για την υπεροξειδωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου και τον σχηματισμό νερού και οξειδωμένης γλουταθειόνης(GSSG). Μέσω της δράσης της αναγωγάσης της γλουταθειόνης(GSR) και του NADPH, η GSSG μετατρέπεται ξανά σε GSH. Μία ακόμη δράση της GSH, είναι η άμεση εξουδετέρωση του μονήρους ηλεκτρονίου του οξυγόνου (singlet oxygen), όπως και η αναγέννηση των εξωγενών αντιοξειδωτικών-κατεχινών. Τα μόρια SOD, όπως και κάποιες κατηγορίες αυτών, SOD-1 (Cu/Zn-SOD) και SOD-2 (Mn-SOD), βρίσκονται στο μιτοχονδριακό εξωμεμβρανικό χώρο και συγκεκριμένα τα Mn-SOD, εξουδετερώνουν τις ελεύθερες σουπεροξειδωτικές ρίζες, που δημιουργούνται από την μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων.(Khurana et al. 2013)

Τα εξωγενή αντιοξειδωτικά, οι κατεχίνες, είναι ικανές να εξουδετερώνουν και να δημιουργούν ελεύθερες ρίζες. Το ευεργετικό αποτέλεσμα που παρουσιάζουν, πιθανός να οφείλεται στο συνδυασμό των παραπάνω δύο μηχανισμών. Οι κατεχίνες, εμφανίζουν την αντιοξειδωτική τους δράση, απενεργοποιώντας τα μόρια ROS, εγκλωβίζοντας χηλικά, τα οξειδοαναγωγικώς ενεργά ιόντα των μετάλλων μετάπτωσης, αναστέλλοντας τα προοξειδωτικά ένζυμα και προάγοντας την δράση των αντιοξειδωτικών ενζύμων.

Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των κατεχινών, οφείλονται στην φαινολική ομάδα της μοριακής δομής τους. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού των ομάδων υδροξυλίων και των πυρογαλλικών ομάδων με την απενεργοποίηση των ανιόντων σουπεροξειδίου, ως κύριο υπεύθυνο την γαλλική ομάδα, για την εξουδετέρωση των ριζών υδροξυλίου. Η αντιοξειδωτική τους ικανότητα, εξαρτάται επίσης, από τον αριθμό και την θέση των υδροξυλομάδων και τις πιθανές συζεύξεις τους. Κατ' επέκταση, η εστεροποίηση των υδροξυλίων, μπορεί να μειώσει την αντιοξειδωτική δράση των κατεχινών.(Braicu et al. 2013; Khurana et al. 2013)

Προοξειδωτική δράση

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, οι κατεχίνες κατέχουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Από την άλλη πλευρά όμως, άλλες αναλύσεις αναφέρουν ένα προ-οξειδωτικό χαρακτήρα των κατεχινών. Ο χαρακτήρας αυτός, οφείλεται στο οξειδοαναγωγικό

σύστημα κατεχίνης-κινόνης.

Η καρβονυλική ομάδα των κινονών, συμμετέχει σε διάφορες αντιδράσεις οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενώσεων με ομάδες υδροξυλίων. Οι απλές κινόνες, δρουν ως προ-οξειδωτικά με την δημιουργία δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS), μέσω του οξειδοαναγωγικού κύκλου.(Braicu et al. 2013)

Συγκεκριμένα για την EGCG, έχει αναφερθεί ότι η αυτοοξειδωσή της, παράγει υπεροξειδίο του υδρογόνου στο θρεπτικό υλικό των κυτταρικών καλλιιεργειών, με ή και χωρίς κύτταρα. Η προσθήκη SOD και καταλάσης, διακόπτει, κάποιες κυτταρικές δράσεις της EGCG, αναστέλλοντας την αυτό-οξειδωσή και τον διμερισμό της. Η EGCG λειτουργεί σε δύο μονοπάτια, έτσι ώστε να προάγει την κυτταροτοξικότητα στην αντικαρκινική δραστηριότητα. Το ένα μονοπάτι, είναι άμεσο, με την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου με το πυρογαλλικό τμήμα και το άλλο μονοπάτι, με την αναγωγή του σιδήρου τρισθενούς σιδήρου, Fe(III), σε δισθενή σίδηρο, Fe(II). Ο Fe(II), ενεργοποιεί την αντίδραση Fenton (Καταλυτική αντίδραση σιδήρου για την παραγωγή δραστικών ριζών), δημιουργώντας περισσότερα πιθανά είδη δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS), όπως υδροξυλικές ρίζες. Ο συνδυασμός των ριζών υδροξυλίου και του υπεροξειδίου του υδρογόνου, συνεισφέρει, στο αποτέλεσμα της κυτταροτοξικότητας που προκαλεί η EGCG, σε υψηλές συγκεντρώσεις (>50μM).

Άλλες μελέτες, δείχνουν ότι η N-ακετυλοκυστείνη (NAC), είναι ικανή να προστατεύσει από την κυτταροτοξικότητα, η οποία επάγεται, από το υπεροξειδίο του υδρογόνου, αλλά δεν φαίνεται κάποια δράση αυτής, όσον αφορά, την προστασία από τον κυτταρικό θάνατο που προκύπτει από την δράση της EGCG. Επομένως, αυτό δείχνει ότι το κυτταροτοξικό αποτέλεσμα στα καρκινικά κύτταρα δεν προκύπτει μόνο από το υπεροξειδίο του υδρογόνου. Επίσης, φαίνεται, ότι η EGCG έχει επιλεκτικούς καρκινικούς μηχανισμούς, για μιτοχονδριακή καταστροφή, πλην την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου.(Kim et al. 2014)

Αντικαρκινικός μηχανισμός

Το αντικαρκινικό αποτέλεσμα του πράσινου τσαγιού έχει εξεταστεί in vitro και in vivo. Οι μοριακοί μηχανισμοί που συμμετέχουν είναι περίπλοκοι. Οι διάφοροι αυτοί μηχανισμοί, μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις κατηγορίες: αντιοξειδωτική/προοξειδωτική δράση, επίδραση στην δράση των ενζύμων και την

τροποποίηση συγκεκριμένων μοριακών στόχων ή σηματοδοτικών μονοπατιών σχετικών με την ανάπτυξη καρκίνου. Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι κατεχίνες, μπορεί να επηρεάσουν παραπάνω από έναν στόχους.

Οι μελέτες που ασχολήθηκαν με τον μηχανισμό αντικαρκινικής δράσης του πράσινου τσαγιού, επικεντρώθηκαν κυρίως στο μόριο της EGCG, αν και επίσης φαίνεται να έχουν παρόμοια δράση και η καμπεφερόλη και η κερκετίνη. Η EGCG, μπορεί να στοχεύσει σε πολλαπλά μονοπάτια που σχετίζονται με το αποτέλεσμα του καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου των εξής: επιδερμικό αυξητικό υποδοχέα (EGFR), αυξητικό παράγοντα της ινσουλίνης (IGF), μιτογόνο-ενεργοποιητική πρωτεϊνική κινάση (MAPK)/ ρυθμιστική κινάση (ERK) και τα μονοπάτια του NF-κΒ. Στον **πίνακα A.3.1**, φαίνονται οι καρκινικοί στόχοι των κατεχινών.(Zhang et al. 2014; Yu et al. 2014)

Τα μονοπάτια ή στόχοι, επηρεάζουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, ρυθμίζοντας την απόπτωσή τους. Επιπλέον της απόπτωσης, η τελική επίπτωση αυτών των στόχων στα καρκινικά κύτταρα, σχετίζεται κυρίως με την αγγειογένεση, πολλαπλασιασμό και γονιδιακή βλάβη.(Zhang et al. 2014)

Προστατευτικός καρδιαγγειακός μηχανισμός

Ο μηχανισμός προστασίας από καρδιαγγειακά έχει αποδειχθεί ότι επιτυγχάνεται μέσω πολλαπλών μηχανισμών, όπως, τον αντιοξειδωτικό, αντιυπερτασικό, αντιφλεγμονώδες, αντιπολλαπλασιαστικό, αντιθρομβογενετικό και το αποτέλεσμα της μείωσης των λιπιδίων. Το αντικαρδιαγγειακό αποτέλεσμα, επίσης, επιτυγχάνεται μέσω της επίδρασης των κατεχινών στα μονοπάτια που σχετίζονται με τον καρκίνο, όπως ήδη έχουν αναφερθεί στην προηγούμενη υποενότητα. Ωστόσο, την άμεση συσχέτιση των κατεχινών με το αποτέλεσμα της καρδιαγγειακής νόσου κατέχει το μονοπάτι της αγγειακής συστολής των λείων μυϊκών ινών. Σε αυτό το μονοπάτι, συμμετέχουν οι 8 πρωτεΐνες Cyt p450, PLA, CaM, MLCK, PKC, MEK, PKA, και MLCK οι οποίες επηρεάζουν την μυοσίνη και κατ'επέκταση την καρδιαγγειακή προστασία (**Εικόνα A.3.1**). (Zhang et al. 2014)

Ακόμα, τα μόρια ROS και το οξειδωτικό στρες, παράγοντες που προσδίδουν τοξικά αποτελέσματα σε έναν μεγάλο αριθμό οργανικών συστημάτων και κυτταρικών διεργασιών, σχετίζονται με το αποτέλεσμα της καρδιαγγειακής νόσου. Έτσι, η άμεση

αντιοξειδωτική λειτουργία των πολυφαινολών και η έμμεση, προαγωγή της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού, με την επαγωγή των αποτοξινωτικών ενζύμων, όπως ήδη έχει συζητηθεί, επιφέρει σημαντικά θετικό αποτέλεσμα στην καρδιαγγειακή προστασία.(Khurana et al. 2013)

Αντιδιαβητικός μηχανισμός

Ο ακριβής μηχανισμός δράσης του πράσινου τσαί στον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, που έχει προταθεί, είναι ακόμα ασαφής, παρόλα αυτά έχουν διατυπωθεί 3 πιθανοί μηχανισμοί που μπορεί να ευθύνονται για την προστασία στη μη ανάπτυξη του T2DM.

Ο πρώτος μηχανισμός, αναφέρεται στο θετικό αποτέλεσμα του τσαί όσον αφορά την βελτίωση του φαινομένου αντίστασης στην ινσουλίνη. Ο δεύτερος μηχανισμός, είναι μέσω της επίπτωσης του τσαί στην ηπατική γλυκονεογέννεση, ο οποίος φαίνεται να ισχύει και για τα υπόλοιπα είδη τσαί. Ο τρίτος μηχανισμός, αναφέρεται στην προστατευτική δράση του τσαί στους παγκρεατικούς ιστούς.

Όσο το πράσινο, τόσο και το μαύρο τσαί, διατηρούν τον μηχανισμό έκκρισης της ινσουλίνης και προστατεύουν τα β-κύτταρα του παγκρέατος.(J. Yang et al. 2014)

Οι Shoude Zhang et al(Zhang et al. 2014), εντόπισαν 3 μονοπάτια(p53 σηματοδοτικό μονοπάτι, σηματοδοτικό μονοπάτι της νευροτροφίνης και το μονοπάτι του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2) που σχετίζονται με την εμφάνιση του διαβήτη. Σύμφωνα με τα 3 αυτά μονοπάτια σχηματίστηκε το σχετικό μονοπάτι (**Εικόνα A.3.2**), που τα ενσωματώνει. Μελέτες που ανέλυσαν το μονοπάτι p53, απέδειξαν ότι η υπεργλυκαιμία με τον διαβήτη προάγουν την μυοκυτταρική απόπτωση, όπου συμβαίνει με την ενεργοποίηση της δράσης του p53. Όπως φαίνεται και από την **Εικόνα A.3.2**, εκτός από το μονοπάτι p53, οι πολυφαινόλες, μπορούν να επηρεάσουν τον κυτταρικό κύκλο, τροποποιώντας του στόχους p21, κυκλίνη D, CDK4/6 και το Cdc2.

Επιπλέον, η απόπτωση των κυττάρων μπορεί να τροποποιηθεί μέσω του στόχου Fas και BAX. Το μονοπάτι ICF-1/mTOR, το οποίο οδηγεί σε επιπλοκές όσον αφορά την αντίσταση στην ινσουλίνη και στο αποτέλεσμα του διαβήτη, μπορεί να τροποποιηθεί από τις πολυφαινόλες στοχεύοντας σε μία πρωτεΐνη του συγκεκριμένου μονοπατιού, την PTEN. Επίσης, στο μονοπάτι του σακχαρώδη

διαβήτη τύπου 2, οι πρωτεΐνες INSR, ERK και PI3K που συνεισφέρουν στην αντίσταση της ινσουλίνης, επηρεάζονται από την δράση των πολυφαινόλων. Το τελευταίο μονοπάτι που επηρεάζουν οι πολυφαινόλες, περιέχει την πρωτεΐνη κλειδί GK (HK1), η οποία σχετίζεται με την μετατροπή της γλυκόζης σε ATP και έτσι συνεισφέρει στην μείωση έκκρισης της ινσουλίνης, μέσω της ενεργοποίησης της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας. (Zhang et al. 2014)

Μηχανισμός μείωσης βάρους

Το φαινόμενο της παχυσαρκίας, αποτελεί μια διατροφική και μεταβολική διαταραχή, η οποία κλινικά, εκδηλώνεται με υπερπλασία και υπερτροφία των λιπαρών κυττάρων.

Η υπερπλασία των λιπαρών κυττάρων, προκαλείται, από τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των προ-λιποκυττάρων, διαταραχή, η οποία, μπορεί να οδηγήσει σε υπερβολική εναπόθεση λίπους στον λιπώδη ιστό και άμεσα να επηρεάσει την σύσταση του σώματος και την θνησιμότητα από την παχυσαρκία και τις συσχετιζόμενες ασθένειες. Τα παραπάνω, αναπτύσσονται, στην περίπτωση που η πρόσληψη της ενέργειας είναι μεγαλύτερη από την ενέργεια που καταναλώνεται. Επιπλέον, ο πολλαπλασιασμός των λιπαρών κυττάρων, ελέγχεται κυρίως από τα γονίδια, ενώ οι διατροφικοί παράγοντες, επίσης κατέχουν σημαντικό ρόλο.

Η έκταση των λιποκυττάρων είναι στενά συνδεδεμένη με το επίπεδο της ενέργειας στην δίαιτα. Οι μελέτες που επικεντρώθηκαν στο αποτέλεσμα των κατεχινών του πράσινου τσαΐ στη θερμογένεση και την οξειδωση των υποστρωμάτων, έδειξαν, και στις δυο περιπτώσεις, να συνδέονται με την δράση του νευρικού συμπαθητικού συστήματος. Άλλοι πιθανοί μηχανισμοί, περιλαμβάνουν την τροποποίηση του αισθήματος της όρεξης, απενεργοποιώντας τα ένζυμα που εμπλέκονται στον ηπατικό λιπιδικό μηχανισμό, με αποτέλεσμα την μείωση της απορρόφησης των συστατικών. Κάποιοι από τους μηχανισμούς δράσης παρουσιάζονται στην **Εικόνα A.3.3**, ύστερα από πειράματα σε κυτταρικές καλλιέργειες και σε ζώα. (Huang et al. 2014)

A.3.3 Μελέτη της γαλλικής επιγαλλοκατεχίνης (EGCG)

Η EGCG, παρουσιάζει το μεγαλύτερο ευεργετικό αποτέλεσμα στην υγεία από τις υπόλοιπες κατεχίνες, λόγω της παρουσίας της ομάδας γαλλικού οξέος, η οποία ευθύνεται εν μέρει, για τις χηλικές ιδιότητες και την δημιουργία ριζών. Η σταθερότητα των κατεχινών του τσαί, συμπεριλαμβανομένου και της EGCG, εξαρτάται από το pH και την θερμοκρασία. Το κύριο πρόβλημα αποτελεί το υδατικό διάλυμα της EGCG, το οποίο παρουσιάζει περιορισμένη σταθερότητα όταν το pH είναι γύρω στο 4, και είναι σε μεγάλο βαθμό ασταθής σε pH πάνω από το 6.

Σε κάποιες μελέτες, φαίνεται, η διαδικασία του επιμερισμού των κατεχινών, καθώς και της EGCG, να μην επηρεάζει σημαντικά την αντιοξειδωτική ιδιότητά, την απορρόφηση και μεταβολισμό της αρχικής μορφής της κάθε κατεχίνης. Παρόλα αυτά, ο επιμερισμός των κατεχινών, δείχνει, ότι η στερεοχημεία, επηρεάζει την ενεργότητα των ριζών των γαλλικών κατεχινών. Επιπλέον, όμως έχει βρεθεί ότι παράγωγα της EGCG όπως η (-)-GCG (Εικόνα **A.3.4, (α)**), είναι πιο αποτελεσματική όσον αφορά την μείωση της συγκέντρωσης της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων στο πλάσμα από ότι η EGCG (Fangueiro et al. 2014). Η EGCG, διασπάται αρκετά εύκολα. Η μελέτη της σταθερότητας της EGCG στο ρυθμιστικό HEPES, δείχνει ότι η ουσία δεν διατηρεί τις αρχικές της ιδιότητες και πιθανά οφέλη στην υγεία καθώς διασπάται. Όσον αφορά την θερμοκρασία φύλαξης, φαίνεται ότι σε χαμηλές θερμοκρασίες αυξάνεται η σταθερότητά της (χαμηλότερη των 4°C), όπως επίσης και σε χαμηλές τιμές pH (περίπου 3,5)(Fangueiro et al. 2014). Η χρήση αναγωγικών μέσων, όπως το ασκορβικό οξύ που χρησιμοποιείται ευρέως στις μελέτες, παρέχει ακόμα καλύτερη προστασία στην EGCG, αφού την προστατεύει από την οξειδωσή της (**Εικόνα A.3.4, (b,c)**).(Lee et al. 1995; Fangueiro et al. 2014)

Ο κύριος παράγοντας για την διάσπαση της EGCG αποτελεί η οξειδωση της(Smith 2012). Η οξειδωση του μορίου μπορεί να επιτευχθεί με δύο τρόπους, 1) τη συμπύκνωση, με: ένα ήδη υπάρχον μόριο επικατεχίνης και την γαλλική ομάδα του, παράγοντας θειοφλαβίνη, χρωστική με μία βενζοτροπολονική ομάδα και 2) την παραγωγή διμερών επιγαλλοκατεχίνης, όπως οι θειασινενσίνες και τειθθειανίνες. Ο πρώτος τρόπος οξειδωσης, οδηγεί σε ορατά με το μάτι καφέ διαλύματα. Ενώ, ο

δεύτερος τρόπος οξειδωσης, οδηγεί στην δημιουργία θειασινενσινών και τεϊοθειανινών, από την αυτοοξειδοαναγωγή του μορίου.(Fangueiro et al. 2014)

Τα επίπεδα καθαρής EGCG που απορροφούνται, σύμφωνα με μελέτες σε ζώα, φτάνουν περίπου τα 10 μM, ύστερα από στοματική χορήγηση αυτής. Η χορήγηση της EGCG, σε μικρότερες συγκεντρώσεις των 10μM, φαίνεται από την βιβλιογραφία να έχουν σημαντικό αποτέλεσμα σε διάφορες κυτταρικές αποκρίσεις, για παράδειγμα, στην απορρόφηση της γλυκόζης, στην αναστολή της γλυκονεογέννεσης καθώς και σε διάφορες άλλες λειτουργίες, όπως φαίνονται στον

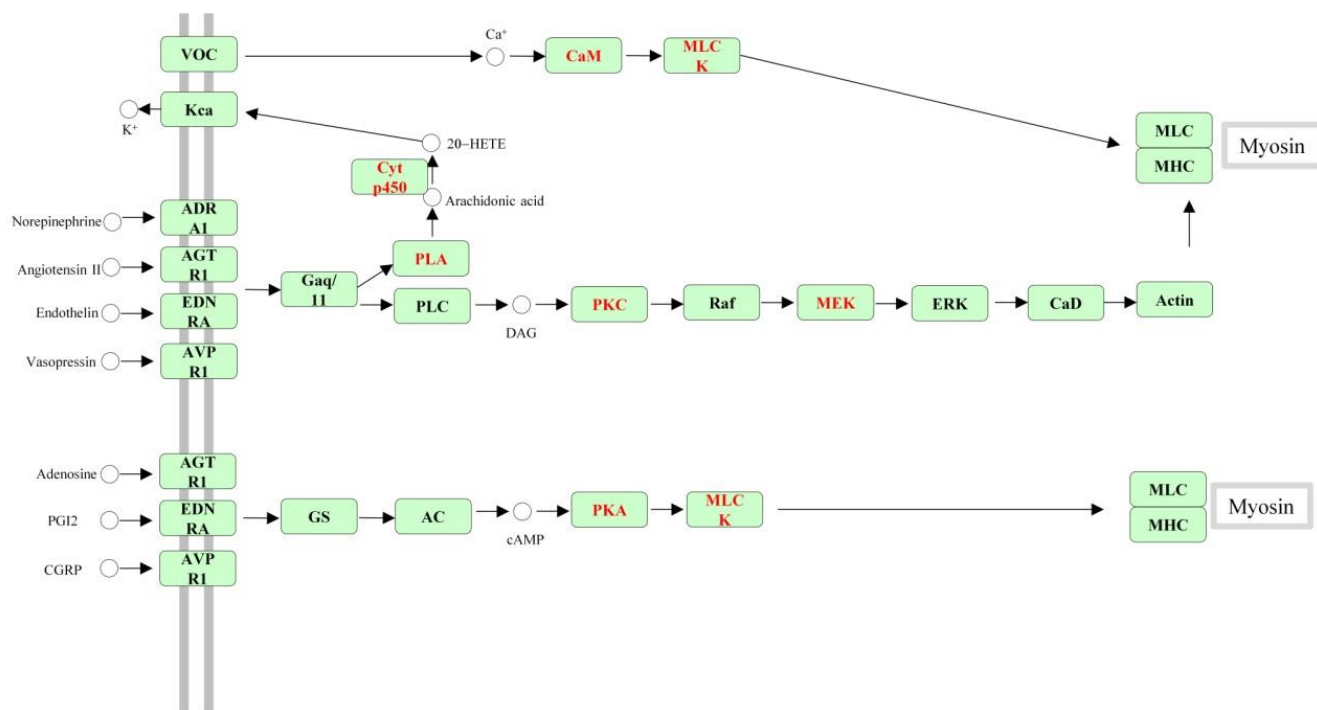
Πίνακα A.3.2.

Αντικαρκινικό αποτέλεσμα	Μοριακοί στόχοι
1.Αντιοξειδωτικά	ROS; χηλίωση μετάλλων ; NF-κB; iNOS; H ₂ O ₂ ; GST; SOD; Nrf2;
2.Αναστολή κυτταρικού κύκλου	Cyclin D, cyclin E; CDK1; CDK2; CDK4; CDK6; Ras; PCNA; p16; p18; p21; p27; p53; mdm2; hTERT
3.Αναστολή πολλαπλασιασμού	PI3 K; AKT; ERK; EGFR; c-fos; AP-1; NF-κB; IKK; COX-2; JNK; Ras; MEKK1; MEK3; p38; TNF- α;
4.Προαγωγή απόπτωσης	ROS; caspase-3; caspase-8; caspase-9; cyt-c; Bad; Bcl-2; Bcl-xL; Bid; c-myc; c-IAP1; c-IAP2; survivin; XIAP; Akt;
5.Αναστολή μετάστασης	MMP-2; MMP-9; uPA; TIMP-2; MT1-MMP; Met; cGMP; urokinase; NO; ephrin-A1; ERK-1/2;
6.Αναστολή αγγειογένεσης	VEGFR; VEGF; ErbB2; ErbB3; FOXO; ERK-1/2; Ephrin-A1; WARS; Wnt; PI3K; IL-6; IL-8; Stat3; MT1-MMP; MMP-2;

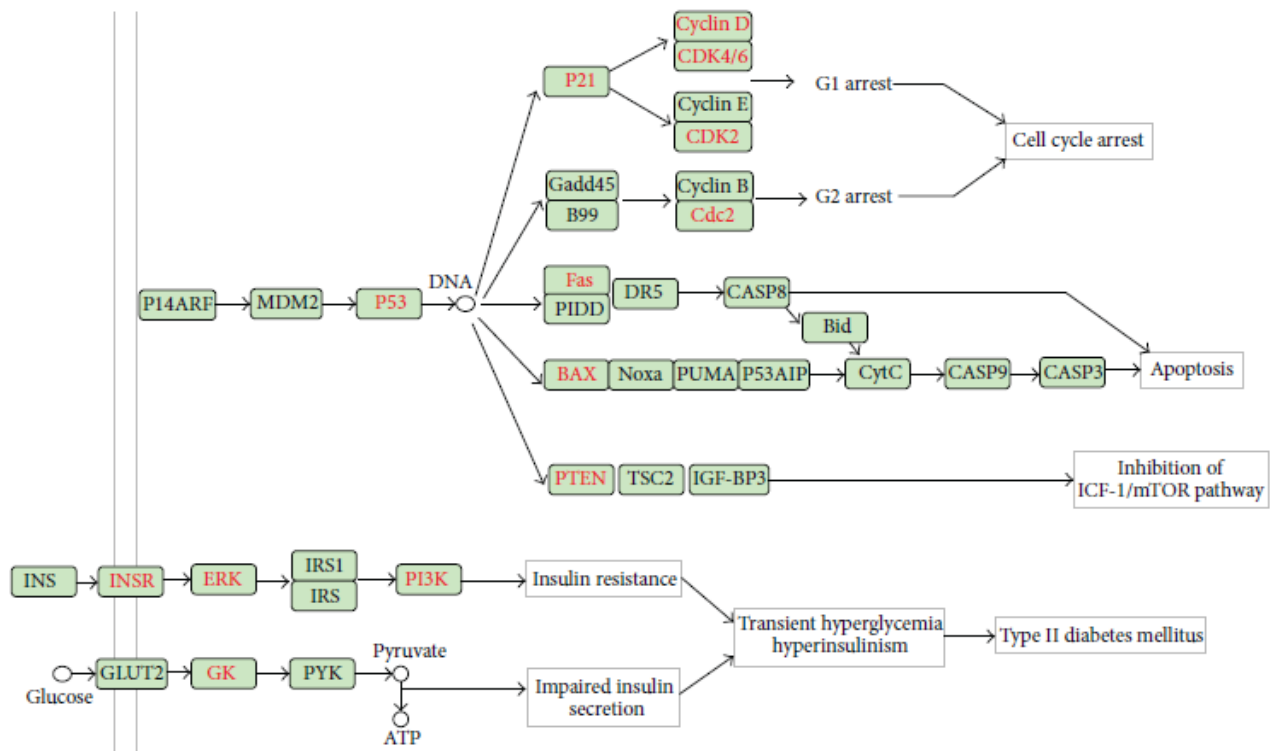
Πίνακας A.3.1 Οι πολλαπλοί στόχοι των κατεχινών, όσον αφορά το καρκινικό αποτέλεσμα.(Yu et al. 2014)

Κυτταρική λειτουργία	Τύπος κυττάρου	Συγκέντρωση EGCG(μM)	Μηχανισμός
Απορρόφηση Γλυκόζης	3T3-L1	< 5	Αντιοξειδωτικός
Διαφοροποίηση λιποκυττάρων	3T3-L1	5-10	Αύξηση ρύθμισης λιπογενή γονιδίων
Αναστολή γλυκονογένεσης	Ηπατοκύτταρα	< 1	CaMKKβ/AMPK προοξειδωτικός
Αυτοφαγία	Ενδοθηλιακά κύτταρα	10	Ca ²⁺ /CaMKKβ
Αυτοφαγία/Αντικαρκινική(κυτταρικός θάνατος)	Καρκίνος	> 50	Προοξειδωτικός
Μετασηματισμός	Καρκίνος	20	Αναστολή AP-1
Προστασία	HaCaT	> 20	Προοξειδωτικός
Αντι-πολλαπλασιασμός	Καρκίνος	> 20	Προοξειδωτικός

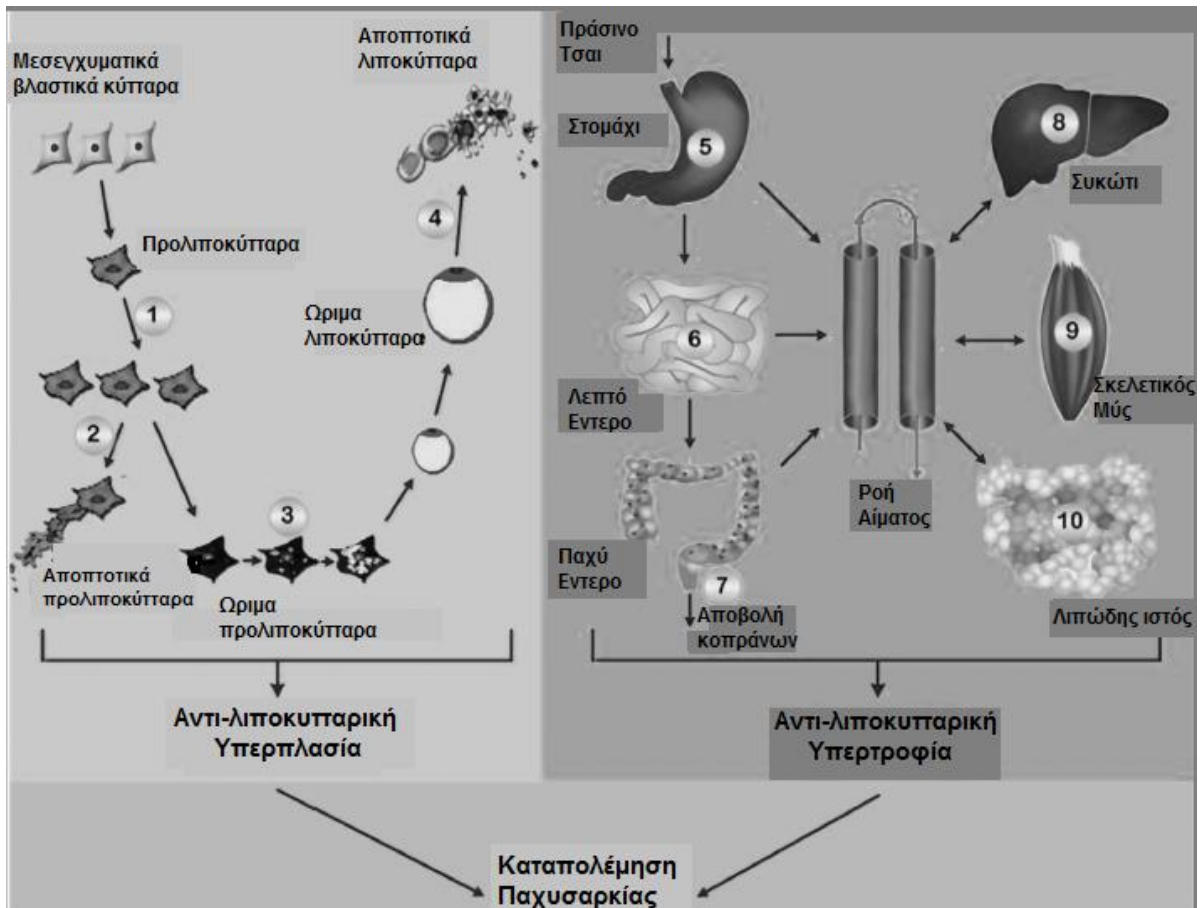
Πίνακας A.3.2 Δράσεις της χορήγησης EGCG, στις διάφορες κυτταρικές αποκρίσεις. (Kim et al. 2014)



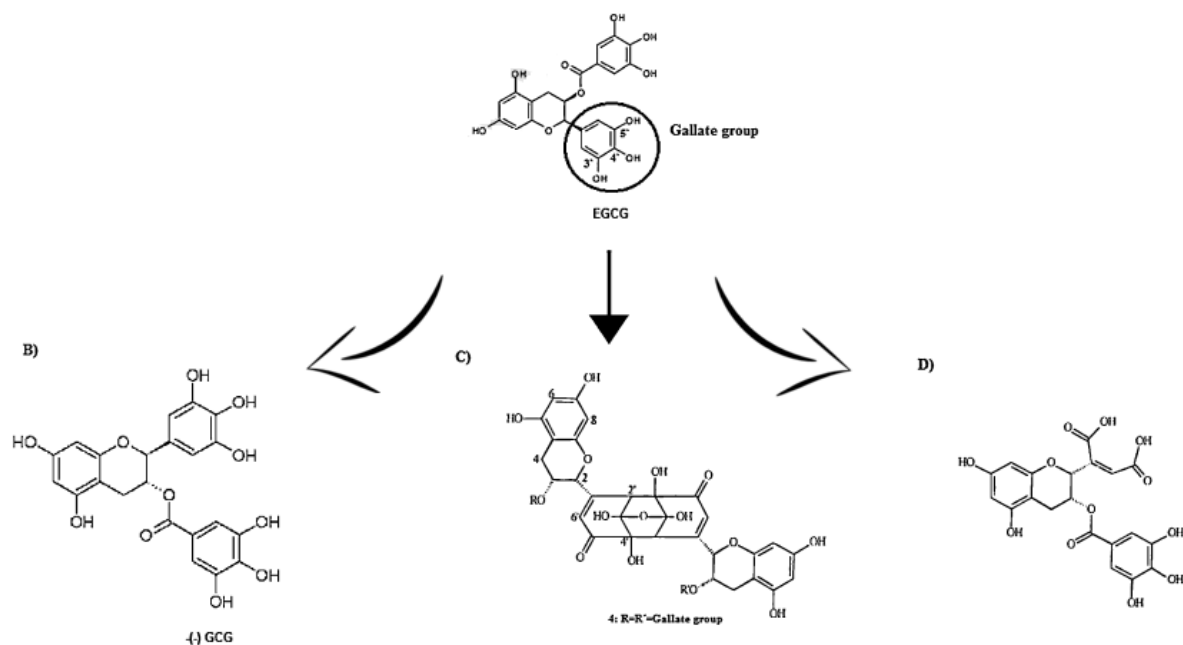
Εικόνα A.3.1 Μονοπάτια που μεσολαβούν οι πολυφαινόλες του πράσινου τσαί στο αποτέλεσμα της καρδιαγγειακής νόσου. Το συγκεκριμένο μονοπάτι αποτελεί ένα κομμάτι από το μονοπάτι αγγειακής συστολής των λείων μυϊκών ινών. Οι στόχοι, παρουσιάζονται με το όνομα του γονιδίου. Οι στόχοι που ρυθμίζονται από τις πολυφαινόλες συμβολίζονται με κόκκινο. (Zhang et al. 2014)



Εικόνα A.3.2 Μονοπάτι εμφάνισης του διαβήτη. Οι στόχοι αναφέρονται με το όνομα του γονιδίου. Οι στόχοι που ρυθμίζονται από τις πολυφαινόλες του πράσινου τσαί συμβολίζονται με κόκκινο χρώμα. (Zhang et al. 2014)



Εικόνα Α.3.3 Ο μηχανισμός του πράσινου τσαί για την καταπολέμηση της παχυσαρκίας. Ύστερα από την κατανάλωση του ροφήματος, οι κατεχίνες, παρεμβαίνουν στις διαδικασίες απορρόφησης της ενέργειας και του μεταβολισμού, στα ζώα. Οι διαδικασίες αυτές είναι οι εξής: 1) αναστολή του πολλαπλασιασμού των προλιποκυττάρων, (2,4) προαγωγή της απόπτωσης των προλιποκυττάρων και ώριμων λιποκυττάρων, (3) αναστολή της διαφοροποίησης των προλιποκυττάρων και της λιπογένεσης των ώριμων λιποκυττάρων, (5,6) αναστολή της δράσης των πεπτικών ενζύμων του γαστρεντερικού, γαλακτοματοποίηση του αυλού, υδρόλυση και μικυλλιακή διαλυτοποίηση των λιπιδίων και παρέμβαση στην απορρόφηση και ενδοκυτταρική διαδικασία των λιπιδίων, καθώς και την συνένωση και απέκκριση των χυλομικρών στα εντεροκύτταρα, (7) αύξηση της ενέργειας έκκρισης κοπράνων, (8) απενεργοποίηση έκφρασης των ηπατικών γονιδίων των λιπογενετικών ενζύμων και των σχετικών μεταγραφικών παραγόντων, υπερέκφραση των επιπέδων του ηπατικού mRNA των λιπαρών γονιδίων της β-οξειδωσης, (9) παρακίνηση της οξειδωσης των λιπαρών οξέων και απορρόφησης της γλυκόζης στους σκελετικούς μύς, (10) διέγερση της έκφρασης των γονιδίων της λιπόλυσης και των γονιδίων που σχετίζονται με την οξειδωση των λιπαρών οξέων στον λιπώδη ιστό, αναστολή πρόσληψης της γλυκόζης και έκφρασης των γονιδίων που ευθύνονται για την σύνθεση του λίπους στο συγκεκριμένο όργανο. (Huang et al. 2014)



Εικόνα A.3.4 Δομές που προκύπτουν κατά την διάσπαση της EGCG. a) προϊόν (-)-GCG επιμερισμού, b,c) προϊόντα οξείδωσης. (Fangueiro et al. 2014)

A.4 Βιοδιαθεσιμότητα πολυφαινολών

Στις *in vivo* μελέτες, με την χορήγηση μίας μονής δόσης ουσίας, μπορεί να γίνει ανίχνευση στους υπό μελέτη ιστούς, αλλά, είναι δύσκολο να χαρακτηριστεί η βιοδραστικότητα της. Η δυσκολία αυτή έγκειται στο γεγονός ότι με την τακτική πρόσληψη των πολυφαινολών, ακόμα και μικρές ποσότητες μπορούν να απορροφηθούν και έτσι να αυξηθεί η συγκέντρωση τόσο στο πλάσμα όσο και σε κυτταρικό επίπεδο. Με αυτό τον τρόπο, με την τακτική πρόσληψη, μπορεί να αυξηθεί και η βιοδραστικότητά της.

Από την στιγμή που θα εισέλθει η ουσία στον οργανισμό, ο πιο σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την απορρόφηση της είναι το εντερικό σύστημα. Αρχικά, αμέσως μετά την εισαγωγή της ουσίας, η απορρόφηση ορισμένων διαιτητικών πολυφαινολών πραγματοποιείται στο λεπτό έντερο. Στη συνέχεια, οι γλυκοζυλιομένες πολυφαινόλες υδρολύονται, με δύο πιθανούς μηχανισμούς.

Ο πρώτος μηχανισμός, περιλαμβάνει την δράση μίας υδρολάσης (LPH), η οποία υπάρχει στα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου. Το συγκεκριμένο ένζυμο, έχει δύο καταλυτικά κέντρα, το ένα υδρολύει τη λακτόζη και το άλλο συμμετέχει στην

αφαίρεση γλυκοζιτών από τα περισσότερα υδροφοβικά υποστρώματα. Το καταλυτικό κέντρο υδρόλυσης της λακτόζης, φαίνεται να ενισχύει την ενεργότητα του δεύτερου καταλυτικού κέντρου (υδρόλυση γλυκοζιτών από τις φαινόλες). Οι απελευθερωμένες αγλυκόνες που προκύπτουν, εισέρχονται στα επιθηλιακά κύτταρα με παθητική διάχυση, ως αποτέλεσμα από την αύξηση της υδροφοβικότητας.

Ο δεύτερος μηχανισμός, περιλαμβάνει το ένζυμο κυτοσολική γλυκοσιδάση (CBG), το οποίο βρίσκεται μέσα στα επιθηλιακά κύτταρα, όπου οι πολικοί γλυκοζίτες μεταφέρονται μέσω του νάτριο-εξαρτώμενου μεταφορέα γλυκόζης SGLT1.

Όσες πολυφαινόλες δεν απορροφούνται στο λεπτό έντερο, φτάνουν στο παχύ έντερο, όπου εκεί τους συμβαίνουν ουσιαστικές δομικές τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, η μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου, υδρολύει τους γλυκοζίτες σε αγλυκόνες και τελικά τις αποικοδομεί σε απλά φαινολικά οξέα. Η διαδικασία αυτή είναι πολύ σημαντική για την βιολογική δράση των πολυφαινολών, καθώς παράγονται ενεργοί μεταβολίτες από την μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου. Στο σημείο αυτό, αξίζει να αναφερθεί ότι η διαδικασία αυτή μπορεί να διαφέρει από άτομο σε άτομο, διότι εξαρτάται από το είδος των βακτηρίων που φιλοξενεί ο κάθε οργανισμός.

Πριν την απελευθέρωση των πολυφαινολών στο αίμα, οι αγλυκόνες-πολυφαινόλες, υφίστανται μία ακόμη τροποποίηση στη δομή τους λόγω της διαδικασίας σύζευξής τους, που λαμβάνει χώρα στο λεπτό έντερο και κυρίως στο συκώτι. Η σύζευξη, περιλαμβάνει την μεθυλίωση, τη θείωση και τη γλυκοζυλίωση. Η μεταβολική αυτή διαδικασία, συνεισφέρει στη διαδικασία της αποτοξίκωσης, η οποία είναι αρκετά σημαντική για πολλές ξеноβιοτικές ενώσεις, αφού με αυτό τον τρόπο περιορίζονται οι πιθανές τοξικές επιδράσεις τους. Η σύζευξη αυτή, διευκολύνει την απέκκριση των τοξικών αυτών ουσιών, μέσω της χολής και των ούρων, αφού, αυξάνεται η διαλυτότητα και το μοριακό τους βάρος. Όσον αφορά την διαλυτότητα, είναι ένας σημαντικός παράγοντας, όπου δυσκολεύει την μεταφορά των πολυφαινολών στις υδροφοβικές λιπιδικές κυτταρικές διπλοστοιβάδες. Η EGCG είναι αρκετά υδρόφιλη, διότι έχει αρκετές υδροξυλομάδες και έτσι ανιχνεύεται πιο γρήγορα από το συκώτι και απεκκρίνεται (D'Archivio et al. 2010; Khurana et al. 2013).

Ιστορικά, γνωρίζουμε ότι στο σύνολό τους οι πολυφαινόλες, με την σύζευξη τους, απενεργοποιούνται με αποτέλεσμα να χάνουν τις ευεργετικές ιδιότητές τους (Hu 2007).

Το ένζυμο Κατεχόλη-Ο-μεθυλομεταφοράση (COMT), καταλύει την μεταφορά μίας μεθυλικής ομάδας από την αδενосуλομεθειονίνη στις πολυφαινόλες που περιέχουν μια χαρακτηριστική διφαινολική ομάδα, όπως η κατεχίνη. Το συγκεκριμένο ένζυμο, βρίσκεται σε ένα μεγάλο αριθμό ιστών, αλλά την μεγαλύτερη ενεργότητά του, την έχει στο συκώτι και στα νεφρά. Η μεθυλίωση της EGCG από το ένζυμο COMT, την μετατρέπει σε λιγότερο βιοενεργή (D'Archivio et al. 2010; Khurana et al. 2013).

Το ένζυμο θειομεταφοράση (SULT), καταλύει την μεταφορά μίας χαρακτηριστικής ομάδας θείου από την φωσφοαδενοσινη-φωσφοθειάση, σε μία υδροξυλική ομάδα των πολυφαινολών. Η θείωση συμβαίνει κυρίως στο συκώτι.

Το ένζυμο ουριδίνη-5-διφωσφορική γλυκουρονοσυλομεταφοράση (UGTs), συνδέεται στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου σε πολλούς ιστούς και εκεί καταλύεται η μεταφορά ενός γλυκουρονικού οξέος στις πολυφαινόλες. Η γλυκοζυλίωση των πολυφαινολών αρχικά πραγματοποιείται στα εντεροκύτταρα πριν την πλήρη σύζευξή τους στο συκώτι.

Τα σημεία στα οποία γίνονται οι συζεύξεις φαίνονται στην **Εικόνα A.4.1**.

Παρόλο που η διαδικασία σύζευξης από την μία πλευρά παράγει ενεργούς μεταβολίτες από κάποιες διαιτητικές πολυφαινόλες, από την άλλη πλευρά, μειώνει το συνολικό ποσό των πολυφαινολών στη κυκλοφορία του αίματος, αυξάνοντας έτσι την απέκκρισή τους.

Η σημαντικότητα των τριών μορφών σύζευξης ποικίλλει, ανάλογα την φύση του υποστρώματος και τη δόση της ουσίας που λαμβάνεται. Η ισορροπία μεταξύ θείωσης και γλυκοζυλίωσης των πολυφαινολών, επίσης, φαίνεται να επηρεάζεται από το είδος του οργανισμού και το φύλο.

Σε γενικά πλαίσια οι μηχανισμοί σύζευξης είναι αρκετά αποτελεσματικοί και η παρουσία αγλυκόνων, είναι σπάνια ή βρίσκεται σε πολλή μικρή συγκέντρωση στο πλάσμα, ύστερα από την κατανάλωση τους. Εξαιρέση όμως, αποτελούν οι κατεχίνες του πράσινου τσαί, οι οποίες μπορούν να βρίσκονται σε μεγάλο ποσοστό ως αγλυκόνες. Συγκεκριμένα, η EGCG, μπορεί να βρίσκεται σε ποσοστό πάνω από

77%.

Είναι σαφές ότι οι πολυφαινόλες τροποποιούνται εκτενώς όχι μόνο στο λεπτό και παχύ έντερο, αλλά, και στο συκώτι, όπου εκεί λαμβάνουν μέρος οι περισσότερες συζεύξεις **(Εικόνα A.4.2)**.

Όλες οι παραπάνω τροποποιήσεις μπορεί να επηρεάσουν σημαντικά την βιολογική ενεργότητα των πολυφαινολών.

Κατά συνέπεια, οι ενώσεις που φτάνουν στα κύτταρα και στους ιστούς είναι χημικά, βιολογικά και σε κάποιες περιπτώσεις λειτουργικά διαφορετικές από την αρχική τους μορφή. (D'Archivio et al. 2010)

Μελέτες (Ge et al. 2012; Smith 2012) που εξέτασαν τη μεταβολική πορεία της EGCG σε ποντίκια, έδειξαν ότι ο μεταβολισμός της, είναι γρήγορος στο πλάσμα και στο ομογενοποιημένο έντερο, ενώ, μεταβολίζεται σχετικά αργά στο ομογενοποιημένο συκώτι. Τα συμπεράσματα των μελετών, είναι ότι η ενεργότητα των μεταβολικών ενζύμων στο πλάσμα είναι πιο ισχυρή απ ότι στο λεπτό έντερο και στο συκώτι. Συγκεκριμένες καρβοξυλεστεράσες (κοξίνη), όπου ευθύνονται για την υδρόλυση της εστερικής ομάδας στο μόριο της EGCG, έχει βρεθεί, ότι υπάρχουν στα ούρα και όχι στα κύτταρα του νεφρού. Έτσι, συμπεραίνουμε ότι η υδρόλυση της EGCG, είναι ισχυρότερη στο πλάσμα απ ότι στο συκώτι και λεπτό έντερο. (Ge et al. 2012)

A.5 Νανοσωματίδια EGCG

Όπως ήδη συζητήθηκε στις προηγούμενες ενότητες, η EGCG αποτελεί την κύρια κατεχίνη του πράσινου τσαί, βρίσκεται σε μεγάλο ποσοστό σε αυτό και είναι εκείνη που έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό, κατέχοντας τις περισσότερες ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία, σε σχέση με τις υπόλοιπες κατεχίνες. Όμως, λόγω της δομής της και της υδροφιλικότητάς της, η EGCG, απεκκρίνεται εύκολα από τον οργανισμό. Για τους παραπάνω λόγους, καταστήθηκε αναγκαίο να βρεθεί, μία εναλλακτική μέθοδος μεταφοράς της EGCG έτσι ώστε να αυξηθεί η διαλυτότητά και η σταθερότητα της και τελικά να διευκολυνθεί η δράση της στον οργανισμό.

Οι λιπιδικές νανοκάψουλες, είναι χρήσιμες, συγκεκριμένα στη μεταφορά φαρμάκων, για υδατικές-αδιάλυτες ενώσεις, ή ενώσεις ευαίσθητες στο pH. Τα νανοσωματίδια, έχουν την δυνατότητα να ενθυλακώνουν τις επιθυμητές ενώσεις και με αυτόν τον τρόπο, να τις σταθεροποιούν και να τις μεταφέρουν, στα σημεία τα οποία μπορούν να προσδώσουν τις ευεργετικές τους ιδιότητες.

Τα νανοσωματίδια, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν μεταφορείς και έχουν μελετηθεί συγκεκριμένα, για τα φλαβονοειδή αποτελούνται από λιπίδια ή πολυσακχαρίτες. Συνήθως, το μέγεθος αυτών, κυμαίνεται στα 20 με 110nm.(Barras et al. 2009)

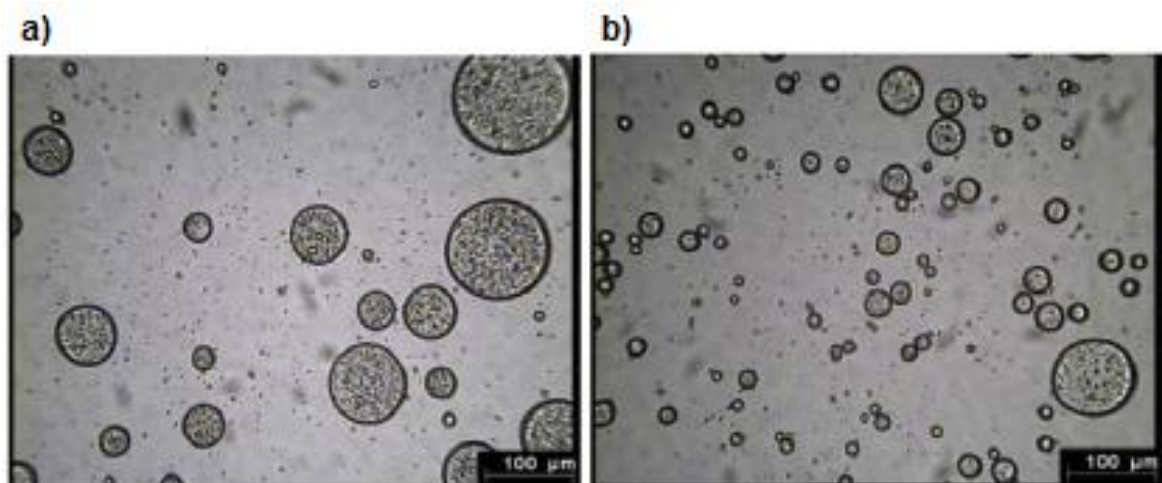
Η νανοτεχνολογία, είναι η μελέτη του ελέγχου της ύλης σε μία ατομική και μοριακή κλίμακα. Γενικά, η νανοτεχνολογία ασχολείται με δομές μεγέθους 100 νανομέτρων ή και χαμηλότερα, σε τουλάχιστον μία διάσταση και περιλαμβάνει την ανάπτυξη υλικών σε τέτοια μεγέθη. Άξιο αναφοράς, είναι το γεγονός ότι τα τελευταία χρόνια, η νανοτεχνολογία, έχει μελετηθεί και εφαρμοστεί σε διάφορα πεδία, όπως στην καρκινική θεραπεία και αναμένεται να οδηγήσει, στη διάγνωση, την ανίχνευση και την θεραπεία του καρκίνου.(Mukhtar 2012)

Ακόμα, τα τελευταία χρόνια έχει γίνει προσπάθεια δημιουργίας νανοσωματιδίων, από γαλακτώματα με σταθεροποιητή κυτταρίνης, απομονωμένης από φυσικά προϊόντα.

Η κυτταρίνη, χρησιμοποιείται, ως σταθεροποιητής των γαλακτωμάτων, λόγω της υψηλής σταθερότητάς της. Συγκεκριμένα, η κυτταρίνη αποτελεί το πιο ευρέως

διαδεδομένο βιοπολυμερές, το οποίο είναι βιοδιασπώμενο και μη τοξικό. Η σύστασή της αποτελείται από ένα πλέγμα-πολυμερή γλυκόζης και βρίσκεται στην φύση στις φυτικές ίνες.(Zorpe et al. 2012)

Η χρήση των βακτηριακών κυτταρινών, σαν σταθεροποιητές στην δημιουργία των νανοσωματιδίων (**Εικόνα A.5.1**), έχει βρεθεί, να είναι περισσότερο αποτελεσματική όταν χρησιμοποιείται σε γαλακτώματα λαδιού-νερού (10% κατά βάρος ελαιόλαδο). Η υψηλή αυτή σταθερότητα οφείλεται στα ινίδια αυτού του είδους της κυτταρίνης, τα οποία προσροφούνται στην επιφάνεια της σταγόνας λαδιού και δημιουργούν ένα ισχυρό πλέγμα. Τα γαλακτώματα από βακτηριακή κυτταρίνη, φαίνεται να μην επηρεάζονται από τις αλλαγές του pH, θερμοκρασίας ή της ιονικής δύναμης συγκριτικά με άλλα είδη γαλακτοματοποιητών.(Paximada et al. 2014)



Εικόνα A.5.1 Μικρογραφία νανοσωματιδίων οργανικού/υδατικού γαλακτώματος, από βακτηριακή κυτταρίνη με δύο τρόπους παρασκευής. α) διάτμηση, β) υπέρηχοι.(Paximada et al. 2014)

A.6 Υγρή Χρωματογραφία

Ο όρος υγρή χρωματογραφία, χαρακτηρίζει οποιαδήποτε χρωματογραφική διαδικασία στην οποία η κινητή φάση είναι υγρή.

Η υγρή χρωματογραφία μπορεί να έχει διάφορες παραλλαγές όσον αφορά το τεχνικό κομμάτι, όπως και τους τρόπους διαχωρισμού. Ειδικότερα, η τεχνική χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) (**Εικόνα A.6.1**), κατέχει μία μεγάλη ποικιλία από διαχωριστικές αρχές. Η κύρια διαφορά μεταξύ της HPLC και των υπόλοιπων χρωματογραφικών τεχνικών με στήλη, είναι η υψηλή πίεση η οποία εφαρμόζεται, έτσι ώστε να γίνει ώθηση της ροής της κινητής φάσης μέσω της στήλης. (Ahuja 2006)

Πλεονεκτήματα της HPLC, αποτελούν, η ευκολία, η ακρίβεια, η ταχύτητα και η ικανότητα να πραγματοποιηθούν δύσκολοι διαχωρισμοί. Επίσης, μπορεί να πραγματοποιηθεί ένα μεγάλος αριθμός διαχωρισμών, με την απλή χορήγηση μικροποσότητας δείγματος.

Η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, χαρακτηρίζεται από μία στατική-σταθερή μη πολική φάση, που τις περισσότερες φορές αποτελείται από παράγωγα ενώσεων του πυριτίου (silica), που ενώνονται με ομάδες δεκαοκτυλίου (π.χ $C_{18}H_{37}$) ή οκτυλίου (π.χ C_8H_{17}). Η κινητή φάση είναι πολική και στις περισσότερες περιπτώσεις είναι μίγμα νερού (ή ρυθμιστικό διάλυμα) με μεθανόλη, ακετονιτρίλιο ή τετραυδροφουράνιο. Αυτό το υγρό έκλουσης, δεν επηρεάζει την επιφάνεια της στατικής φάσης και έτσι, οι ουσίες προς ανάλυση, παραμένουν στη στήλη, όσο τα μόρια αυτών είναι προσκολλημένα στην υδρογονοανθρακική αλυσίδα, διατηρώντας την ενέργεια που έχουν αποκτήσει από την μείωση της επαφής μεταξύ των δύο φάσεων. Έτσι, οι πολικές ουσίες εκλούνται πρώτες, ενώ, τα άπολα μόρια, παραμένουν με ισχυρούς δεσμούς στην στατική φάση, με αύξηση της ισχύς του δεσμού όσο μακρύτερο είναι το μήκος της υδρογονοανθρακικής αλυσίδας του άπολου μορίου. Στην **Εικόνα A.6.2**, απεικονίζεται σχηματικά η πορεία του χρωματογραφικού διαχωρισμού δύο ουσιών.

Οι ιονικές ενώσεις μπορούν να διαχωριστούν στην περίπτωση που σχηματιστεί μία ουδέτερη ιονική σύζευξη με την προσθήκη αντίθετου ιόντος στην κινητή φάση,

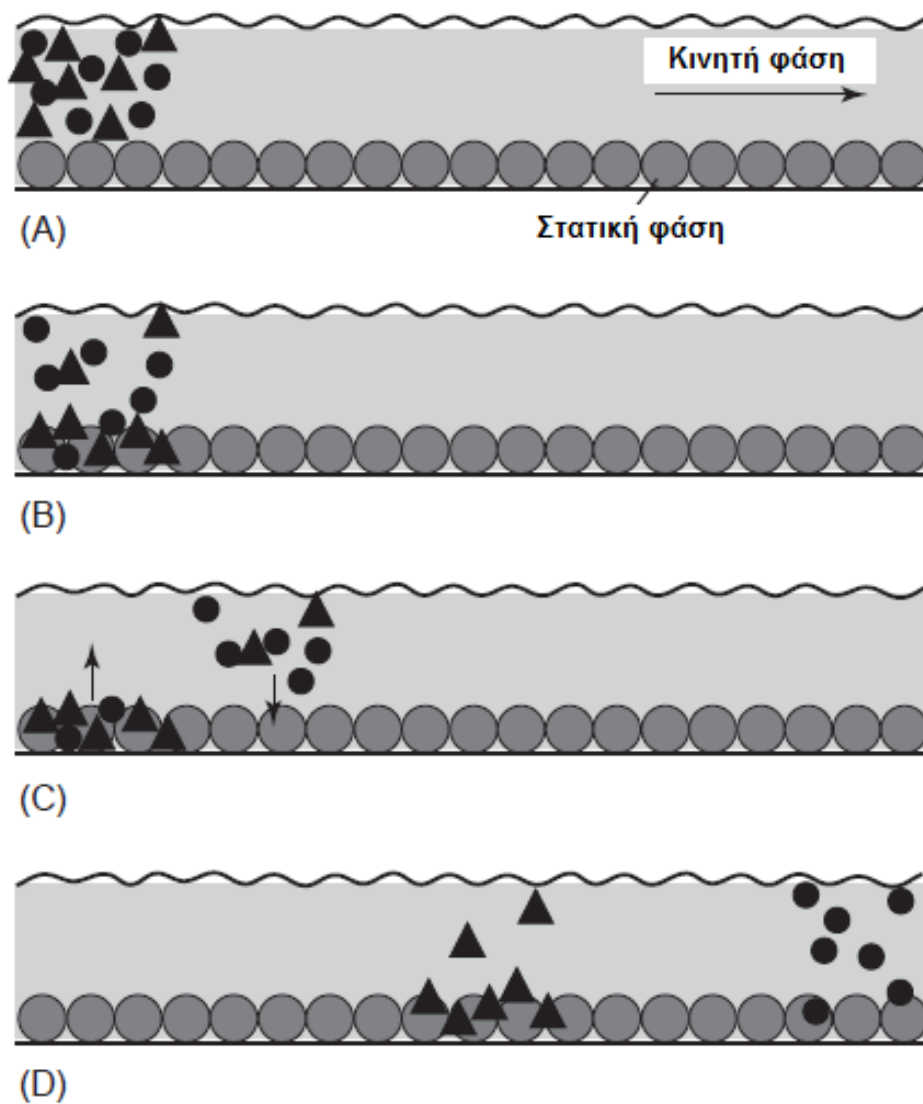
γνωστή ως χρωματογραφία ζεύγους-ιόντων.(Meyer 2013)

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της HPLC αποτελεί η δυνατότητα χρήσης ενός μεγάλου εύρους από ανιχνευτές. Ο ανιχνευτής που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο συγκεκριμένο είδος χρωματογραφίας είναι: ορατού-υπεριώδους, ηλεκτροχημικός, δείκτη διάθλασης, φθορισμού.

Ο ανιχνευτής PDA (photodiode array), παρέχει ένα φάσμα UV ακτινοβολίας των εκλουόμενων κορυφών. Οι περισσότεροι ανιχνευτές, χρησιμοποιούν μία φορτισμένη διάταξη διόδων, με 512-1024 διόδους, ικανές για φασματική ανάλυση του 1nm.(Ahuja 2006)



Εικόνα A.6.1 Απεικόνιση μηχανήματος HPLC.(Ahuja 2006)



Εικόνα A.6.2 Σχηματική απεικόνιση της πορείας του χρωματογραφικού διαχωρισμού 2 ουσιών .a) εισαγωγή του δείγματος, b) καταμερισμός μορίων στις δύο φάσεις, c) ροή της κινητής φάσης και νέα ισορροπία, d) διαχωρισμός των δυο συστατικών, ύστερα από έναν αριθμό διαδικασιών καταμερισμού μεταξύ των δύο φάσεων.(Meyer 2013)

ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της μελέτης, είναι η εκτίμηση της βιοδιαθεσιμότητας της EGCG στο πλάσμα ποντικών, ύστερα από την ανάπτυξη μίας απλής και ακριβής μεθόδου, με την χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Στη συνέχεια, με την παραπάνω μέθοδο, πραγματοποιείται ποσοτικοποίηση της EGCG, στο πλάσμα ποντικών, ύστερα από την χορήγηση της σε ποντίκια, στην καθαρή της μορφή, υπό την μορφή νανογαλακτώματος και τέλος υπό την μορφή μίγματος ελαίου και νερού.

Στο πρώτο στάδιο, πραγματοποιούνται αναλύσεις με την δοκιμή διαφορετικών διαλυτών κινητής φάσης, έτσι ώστε να βρεθεί η ιδανική για τον διαχωρισμό της EGCG από τις άλλες ουσίες της μήτρας, με την εμφάνιση της καλύτερης δυνατής κορυφής.

Στη συνέχεια, κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς στο πλάσμα, μελετάται η γραμμικότητα της ευθείας αυτής όσον αφορά την συγκέντρωση της EGCG σε σχέση με την απορρόφηση, καθώς επίσης μελετάται και η ανάκτηση της EGCG στο πλάσμα ποντικών.

Στο τελευταίο στάδιο, πραγματοποιούνται αναλύσεις στο πλάσμα των 4 ομάδων ποντικών, οι οποίες είναι:

Ομάδα A: ελέγχου,

Ομάδα B: νανογαλάκτωμα EGCG

Ομάδα C: Υδατικό διάλυμα EGCG

Ομάδα D: Διάλυμα EGCG μίγματος νερού:ελαιολάδου (80:20%)

B. Υλικά και μέθοδοι

B.1 Μεταχείριση πειραματόζων –Χορήγηση EGCG

Για την μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν 20 ποντίκια τύπου C57BL/6 (25-30g), τα οποία, αφέθηκαν για τουλάχιστον 1 εβδομάδα, έτσι ώστε να εγκλιματιστούν πριν την έναρξη του πειράματος. Τα ποντίκια στεγάστηκαν σε κλουβιά με ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$) και υγρασίας ($50 \pm 10\%$) και εναλλαγή φωτός, σκοταδιού, κάθε 12 ώρες. Όλα τα ποντίκια έλαβαν, μια τυπική διαίτα υπό μορφή pellet (Altromin 1324, Chr. Petersen, Ringsted, Denmark). Μετά την περίοδο προσαρμογής, τα ποντίκια ζυγίστηκαν και χωρίστηκαν, σε 4 ομάδες των 5 ζώων, ώστε να έχουν όλες οι ομάδες παρόμοιο σωματικός βάρος. Οι ομάδες χωρίστηκαν τυχαία, σε τρεις κατηγορίες, (χορήγηση διαλύματος EGCG, νανοδομής EGCG, διάλυμα λαδιού και EGCG) και μία ομάδα ελέγχου (νερό). Τα ζώα, παρέμειναν, χωρίς τροφή, ένα βράδυ πριν την έναρξη του πειράματος. Οι δομές της EGCG δόθηκαν στα ζώα με τη μέθοδο oral gavage, σε ποσότητα 0,1ml και στη συνέχεια έγινε θανάτωση αυτών, 120 λεπτά μετά τη χορήγηση της ουσίας.

Τα χαρακτηριστικά των ομάδων παρουσιάζονται παρακάτω:

Ομάδα Α: Απεσταγμένο νερό

Ομάδα Β: Νανογαλάκτωμα EGCG: 0,23mg/ml,

Ομάδα Γ: Διάλυμα EGCG 0,23mg/ml,

Ομάδα Δ: Διάλυμα 0,023mg EGCG σε 0,08 ml νερό και 0,02 ml ελαιόλαδο.

- ❖ Η δόση της ουσίας EGCG που χρησιμοποιήθηκε είναι περίπου ίση με την κατανάλωση ενός φλιτζανιού τσάι (0,74mg/ml EGCG), από ένα άτομο μέσου βάρους. Η μετατροπή της δόσης από τον άνθρωπο στο ποντίκι, πραγματοποιήθηκε βάσει της εξίσωσης των Schneider et al.(Schneider et al. 2004)

B.2 Συλλογή δείγματος

Η συλλογή του αίματος, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο cardiac puncture σε φιαλίδια πολυαιθυλενίου που περιείχαν αντιπηκτική ηπαρίνη. Το αίμα, φυγοκεντρήθηκε στα 1600g για 10 λεπτά και στην συνέχεια, έγινε παραλαβή του πλάσματος. Ποσότητα 100 μ L πλάσματος, τοποθετήθηκε σε φιαλίδια πολυαιθυλενίου που περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα 0.4 M φωσφορικού νατρίου(μονοβασικό φωσφορικό νάτριο- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ και διβασικό φωσφορικό νάτριο άνυδρο- Na_2HPO_4) με 20% ασκορβικό οξύ και 0.1% EDTA με τελικό pH 7,4. Όλα τα δείγματα πλάσματος, καταψύχθηκαν (snap frozen) σε ξηρό πάγο διοξειδίου του άνθρακα και έγινε αποθήκευση αυτών, στους -20°C μέχρι την ανάλυσή τους.

B.3 Οργανολογία και συνθήκες HPLC

Η χρωματογραφική ανάλυση, πραγματοποιήθηκε στο μηχάνημα HPLC με τα εξής χαρακτηριστικά:

- *Αντλία:* Jasco PU-2089 Plus,
- *Ροή:* 1ml/min,
- *Ανιχνευτή:* diode array(συστοιχίας διόδων)-Shimadzu SPD-M20A,
- *Στήλη:* Phenomenex Luna™ C18 (μήκους 260 mm, εσωτερικής διαμέτρου 4.6 mm και μέγεθος σωματιδίων 5 μ m)
- *Βαλβίδα εισαγωγής δείγματος:* (rheodyne) με βρόγχο 50 μ L
- *Λογισμικό:* τα δεδομένα και η ολοκλήρωση αυτών, πραγματοποιήθηκαν στο λογισμικό LC solution, έκδοσης 1.24.

Πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις προτύπων χαμηλών συγκεντρώσεων, με 3 είδη διαφορετικών κινητών φάσεων, (Υδατικό διάλυμα 0,1% κιτρικού οξέος και ακετονιτρίλιο(86:14)(Fu et al. 2008), Υδατικό διάλυμα 1% οξικού οξέος και ακετονιτρίλιο(87,5:12,5)(Dube et al. 2011a), Υδατικό διάλυμα με φωσφορικό οξύ και ακετονιτρίλιο σε αναλογία 84,9: 0,1:15, αντίστοιχα, έτσι ώστε να βρεθεί η βέλτιστη κινητή, η οποία μπορεί να διαχωρίσει τις κορυφές μεταξύ τους (χωρίς να υπάρχουν αλληλεπικαλύψεις) και να παρουσιάζει κορυφές με σωστό σχήμα, χωρίς την εμφάνιση ουράς.

B.4 Προετοιμασία διαλυμάτων-προτύπων EGCG

Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος, pH=5

Το συγκεκριμένο διάλυμα, χρησιμοποιείται για την ρύθμιση του pH στην τιμή 5. Η επιλογή του συγκεκριμένου pH, γίνεται, διότι αποτελεί τις ιδανικές συνθήκες δράσης των ενζύμων που χρησιμοποιούνται στις αναλύσεις (Anatomy 1953).

Η σύσταση του συγκεκριμένου υδατικού διαλύματος, αποτελείται από:

-Οξικό οξύ (CH_3COOH), 0,031 mol/l

-Οξικό νάτριο (CH_3COONa), 0,068 mol/l

Αντιοξειδωτικό διάλυμα, pH=3

Λόγω της αυξημένης αστάθειας της EGCG στα διαλύματα (Fangueiro et al. 2014; Lee et al. 1995), παρασκευάζεται διάλυμα με ασκορβικό οξύ ως αντιοξειδωτικό, έτσι ώστε να αποτραπεί η οξειδωση της EGCG στα δείγματα και EDTA, έτσι ώστε να γίνει χηλική δέσμευση πιθανών μετάλλων που θα επιτάχυναν την διαδικασία της οξειδωσης. Το συγκεκριμένο διάλυμα, μετά την παρασκευή του, φυλάσσεται σε σκοτεινό μέρος καλυμμένο με αλουμινόχαρτο.

Η σύσταση του συγκεκριμένου υδατικού διαλύματος, αποτελείται από:

-Φωσφορικό οξύ (H_3PO_4), 0,005 mol/l.

-Δισόξινο φωσφορικό νάτριο (NaH_2PO_4), 0,044 mol/l.

- Na_2EDTA , 0,05% w/v.

-Ασκορβικό οξύ, 2% w/v.

Διάλυμα E

Το συγκεκριμένο διάλυμα, χρησιμοποιείται για την επαναδιαλύτωση των εκχυλισμάτων του πλάσματος, προκειμένου να εισαχθούν στην HPLC (συνθήκες παρόμοιες με αυτές της κινητής φάσης).

Η σύσταση του συγκεκριμένου υδατικού διαλύματος, αποτελείται από:

-Φωσφορικό οξύ (H_3PO_4), 0,005 mol/l.

-Δισόξινο φωσφορικό νάτριο (NaH_2PO_4), 0,044mol

-Ακετονιτρίλιο (CH_3CN), 15%v/v.

Προετοιμασία ενζύμων

Η χρήση των ενζύμων στα διαλύματα του πλάσματος, γίνεται, έτσι ώστε να απομονώσουμε την ολική ποσότητα σε EGCG, καθώς, η EGCG, όπως ήδη έχει αναφερθεί στο θεωρητικό μέρος, μπορεί να πραγματοποιήσει σύζευξη με γλυκοζίτες και σουλφιδικές ομάδες. Από την βιβλιογραφία (Fukuda et al. 2009; Lee et al. 2000), η ιδανική ενεργότητα για την βέλτιστη δράση των ενζύμων σουλφατάση και γλυκουρονιδάση, σε δείγμα πλάσματος, είναι 1U και 250U, αντίστοιχα.

Επομένως, γίνεται παρασκευή δύο διαλυμάτων-ενζύμων σουλφατάσης και γλυκουρονιδάσης, 500ml το καθένα (αρχική ενεργότητα σουλφατάσης:10000U/g και γλυκουρονιδάσης:100000U/ml), σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος και στην συνέχεια αναμειγνύονται έτσι ώστε να προκύψει η επιθυμητή, τελική ενεργότητα (σουλφατάση και γλυκουρονιδάση, 1U και 250U, αντίστοιχα).

Τέλος, το μίγμα των ενζύμων, αναλύθηκε στην HPLC, έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί ότι τα ένζυμα δεν περιέχουν EGCG, η οποία θα μπορούσε να επηρεάσει τα τελικά αποτελέσματα κατά τις αναλύσεις των πλάσμάτων.

Παρασκευή προτύπων EGCG

Αρχικά, παρασκευάστηκε διάλυμα (stock), υψηλής συγκέντρωσης 50mg/l σε αντιοξειδωτικό διάλυμα. Το συγκεκριμένο διάλυμα χωρίστηκε σε φιαλίδια και αποθηκεύτηκε στους $-20^{\circ}C$, μέχρι την χρήση του.

Από το παραπάνω διάλυμα, παρασκευάστηκαν τα πρότυπα διαλύματα εργασίας, συγκεντρώσεων: 440,830,1220,1610,2000 $\mu g/L$ σε αντιοξειδωτικό διάλυμα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό (spiking) του πλάσματος.

B.5 Δοκιμή εκχυλιστικού μέσου

Η διαδικασία των εκχυλίσεων, βοηθάει, στον εμπλουτισμό του δείγματος, δεδομένου των πολύ μικρών, αναμενόμενων συγκεντρώσεων της EGCG στο πλάσμα, καθώς και στην απομάκρυνση παρεμποδίσεων από τη μήτρα του δείγματος.

Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε, δοκιμή δύο διαφορετικών διαλυτών (*οξικού αιθυλεστέρα και μίγμα μεθανόλης:οξικού αιθυλεστέρα (70:30)*), για την εύρεση του κατάλληλου διαλύτη που θα χρησιμοποιηθεί κατά την προεργασία, πριν την ανάλυση στην HPLC, των δειγμάτων πλάσματος.

Ο οξικός αιθυλεστέρας, χρησιμοποιείται ευρέως, ως εκχυλιστικό μέσο για τις περισσότερες βιολογικές αναλύσεις. (Lambert et al. 2003; Dube et al. 2011a)

Η δοκιμή του μίγματος, μεθανόλης-οξικού αιθυλεστέρα, πραγματοποιήθηκε, σύμφωνα με τα πρόσφατα στοιχεία της βιβλιογραφίας, όπου αναφέρουν καλύτερη ανάκτηση της EGCG (Pauli et al. 2014), από τα εκχυλίσματα των φύλλων *Camellia sinensis* L.

B.6 Προετοιμασία δειγμάτων πλάσματος

Στα 100μl πλάσματος που έχουν συλλεχθεί και αποψυχθεί, προστίθενται 20μl ρυθμιστικού οξικού οξέος και 10μl από το διάλυμα του μίγματος ενζύμων, σουλαφατάσης και γλυκουρονιδάσης, 1U και 250U, αντίστοιχα.

Τα δείγματα, επωάζονται στους 37°C για 45 λεπτά και στη συνέχεια ψύχονται σε πάγο έτσι ώστε να σταματήσει η δράση των ενζύμων.

Στο επόμενο στάδιο πραγματοποιούνται εκχυλίσεις του πλάσματος,

Γίνεται προσθήκη 500μl εκχυλιστικού μέσου, το διάλυμα αναμιγνύεται με κυκλοαναδευτήρα για 2 λεπτά και φυγοκεντρείται στα 16000g και σε θερμοκρασία 4°C για 2 λεπτά. Συλλέγεται η οργανική φάση και τοποθετείται σε erpendorf, το οποίο περιέχει ήδη 10μl αντιοξειδωτικού διαλύματος. Η εκχύλιση επαναλαμβάνεται ακόμη μια φορά με τον ίδιο τρόπο και στο τέλος, ενώνονται οι δύο οργανικές φάσεις. Το σύνολο της οργανικής φάσης, εξατμίζεται σε ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού και στη συνέχεια πραγματοποιείται επαναδιαλύτωση με διάλυμα E (Ενότητα B.4).

B.7 Επικύρωση μεθόδου HPLC

B.7.1 Προετοιμασία πρότυπης Καμπύλης Αναφοράς σε πλάσμα

Σε 100ml πλάσματος (τυφλό), προστίθενται 20ml ρυθμιστικού οξικού οξέος και 10ml από τα 5 πρότυπα διαλύματα εργασίας (440, 830, 1220, 1610, 2000 mg/L), έτσι ώστε να παρασκευαστούν πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις EGCG σε πλάσμα . Ανακατεύεται το μίγμα σε κυκλοαναδευτήρα και στη συνέχεια προστίθενται 500ml οξικού αιθυλεστέρα. Το μίγμα, ανακατεύεται για 2 λεπτά σε vortex και στη συνέχεια φυγοκεντρείται, σε 16000g, στους 4°C, για 2 λεπτά. Λαμβάνεται η οργανική φάση και μεταφέρεται σε φιαλίδιο που περιέχει 10ml αντιοξειδωτικού διαλύματος. Στη συνέχεια, προστίθενται άλλα 500ml οξικού αιθυλεστέρα, το μίγμα ανακατεύεται για 3 λεπτά με κυκλοαναδευτήρα, και φυγοκεντρείται στις ίδιες συνθήκες με παραπάνω. Συλλέγεται η οργανική φάση και αναμιγνύεται με την αντίστοιχη της 1^{ης} εκχύλισης.

Τέλος, γίνεται εξάτμιση του διαλύματος, μέχρι ξηρού, επαναδιαλυτώνεται με ποσότητα 100ml από το διάλυμα E (βλέπε ενότητα B.4) και αναλύεται στην HPLC.

❖ Η διαδικασία επαναλήφθηκε εις διπλούν για κάθε συγκέντρωση.

Με την παραπάνω διαδικασία, κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς σε πλάσμα που θα χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων στις 4 ομάδες ποντικών

B.7.2 Προσδιορισμός γραμμικότητας

Από τα παραπάνω δεδομένα κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς με την γραμμική μέθοδο προσαρμογής ελαχίστων τετραγώνων (linear least square regression). Ο άξονας y, απεικονίζει το εμβαδό της χρωματογραφικής κορυφής EGCG και ο άξονας x, συμβολίζει την συγκέντρωση της EGCG σε µg/L.

Η γραμμικότητα της πρότυπης καμπύλης προσδιορίστηκε με το συντελεστή προσδιορισμού R^2 .

B.7.3 Ακρίβεια σε διαδοχικές ημέρες

Η ακρίβεια της μεθόδου, εκτιμήθηκε, υπολογίζοντας την επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση (%RSD), (επαναληψιμότητα, repeatability). Ο υπολογισμός πραγματοποιείται βάσει των εμβαδών (area) από τις κορυφές EGCG του χρωματογραφήματος, των εκχυλισμάτων πλάσματος για 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις EGCG (44,83,122 μg/L). Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν, σε τρεις διαδοχικές ημέρες.

-Το ποσοστό της ακρίβειας ή αλλιώς η % σχετική τυπική απόκλιση, εκτιμήθηκε σύμφωνα με την εξίσωση:

$$RSD(\%) = \frac{\text{Τυπική απόκλιση Area (standard deviation)}}{\text{Μέση τιμή εμβαδού (Area)}} \times 100$$

B.7.4 Ορθότητα μεθόδου (accuracy)

Η ορθότητα της μεθόδου προσδιορίστηκε βάσει της ανάκτησης (recovery) της EGCG από το πλάσμα, και πραγματοποιήθηκε, συγκρίνοντας τα εμβαδά των κορυφών EGCG των προτύπων στο εκχύλισμα του πλάσματος, σε σχέση με τα εμβαδά των κορυφών EGCG των προτύπων που έχουν εισαχθεί απευθείας για ανάλυση, χωρίς προεργασία (στις ίδιες συγκεντρώσεις-44,83,161 μg/L).

-Για την εύρεση του ποσοστού ανάκτησης στο πλάσμα, χρησιμοποιείται η εξίσωση:

$$\text{Ανάκτηση}(\%) = \frac{\text{Area EGCG Εκχυλίσματος πλάσματος}}{\text{Area EGCG Υδατικών διαλυμάτων}} \times 100$$

- Η ανάκτηση, αναφέρεται στην βιβλιογραφία και ως ορθότητα (Accuracy)(Dube et al. 2011a), όπου, στον παραπάνω τύπο, αντί του εμβαδού (Area), εισάγονται οι συγκεντρώσεις, έτσι:

$$\text{Ορθότητα}(\%) = \frac{\text{Μετρούμενη Συγκέντρωση EGCG}}{\text{Θεωρητική Συγκέντρωση EGCG}} \times 100$$

B.8 Ανάλυση Δεδομένων

Τα δεδομένα που λαμβάνονται από το χρωματογράφημα, εμφανίζονται σαν κορυφές σε συγκεκριμένους, χαρακτηριστικούς χρόνους, για κάθε ουσία. Οι κορυφές αυτές, ποσοτικοποιούνται, σύμφωνα με το εμβαδόν τους (Area), ύστερα από την ολοκλήρωσή τους.

Με αυτόν τον τρόπο, έπειτα από την ανάλυση γνωστών συγκεντρώσεων της EGCG, αντιστοιχίζεται η κάθε συγκέντρωση, με μία τιμή εμβαδού. Επομένως, κατασκευάζονται διαγράμματα όπου στον άξονα x εισάγονται οι συγκεντρώσεις και στον άξονα y οι τιμές εμβαδού (Area).

Η στατιστική διαφορά προσδιορίζεται, χρησιμοποιώντας μη παραμετρική ανάλυση ανεξάρτητων μεταβλητών, με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 18.

Γ. Αποτελέσματα

Γ.1 Χρωματογραφικές Συνθήκες

Ο έλεγχος των 2 διαλυμάτων κινητής φάσης, *Υδατικό διάλυμα 0,1% κιτρικού οξέος και ακετονιτρίλιο(86:14)*, *Υδατικό διάλυμα 1% οξικού οξέος και ακετονιτρίλιο(87,5:12,5)*, δεν έδειξε ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά το σχήμα της κορυφής. Συγκεκριμένα, φάνηκε να μην υπάρχει καλή ευαισθησία στην ανίχνευση των μικροποσοτήτων EGCG, που εμβολιάστηκαν για τον έλεγχο. Εμφανίζοντας έτσι, κορυφές με ουρές, όχι οξείες, που δεν μπορούσαν να ποσοτικοποιηθούν, αφού εμφανίζονταν πολύ κοντά στο θόρυβο (baseline) του οργάνου. Αυτό οφείλεται, στο γεγονός ότι το οξικό και το κιτρικό οξύ απορροφούν σε μεγαλύτερα μήκη κύματος συγκριτικά με το φωσφορικό και μειώνουν την ευαισθησία του ανιχνευτή.

Τελικά, ο καλύτερος διαχωρισμός, με την καλύτερη μορφή της κορυφής EGCG, πραγματοποιήθηκε με το υδατικό διάλυμα με φωσφορικό οξύ και ακετονιτρίλιο σε αναλογία 84,9: 0,1:15%v/v, αντίστοιχα. **(Εικόνα Γ.1.1)**

Η σύσταση της ροής της κινητής φάσης, ρυθμίστηκε, με ένα βαθμιδωτό πρόγραμμα από δύο διαλύματα. Το *A διάλυμα* αποτελούνταν απο: 84,9%v/v Υπερκάθαρο νερό, 0,1%v/v φωσφορικό οξύ και 15%v/v ακετονιτρίλιο, ενώ το *B διάλυμα* αποτελούνταν απο: 5%v/v Υπερκάθαρο νερό και 95%v/v ακετονιτρίλιο.

Η κινητή φάση, αντλείται με ροή 1ml/min σύμφωνα με το ακόλουθο πρόγραμμα έκλουσης διαλυτών:

- 0-20min: 100% Διάλυμα A, 0% Διάλυμα B
- 20-25min: 0% Διάλυμα A, 100% Διάλυμα B
- 25-35min: 0% Διάλυμα A, 100% Διάλυμα B
- 35-40min: 100% Διάλυμα A, 0% Διάλυμα B
- 40-45min: 100% Διάλυμα A, 0% Διάλυμα B

- ❖ Η χρήση του διαλύτη B, έγινε, έτσι ώστε μετά την εμφάνιση της ουσίας, EGCG, να ξεπλένεται η στήλη, από τις ουσίες που μπορεί να υπάρχουν στην μήτρα και δεν είναι υπό εξέταση. Με τον τρόπο αυτό, η στήλη καθαρίζεται και είναι έτοιμη για τον εμβολιασμό και ανάλυση του επόμενου δείγματος.

Ο χρόνος κατακράτησης της αναλυόμενης ουσίας ήταν $15,5 \pm 0,5 \text{ min}$ και η εύρεση αυτού, έγινε με την ανάλυση, αρχικά, ενός υδατικού προτύπου EGCG.

Στον χρόνο $15,5 \pm 0,5 \text{ min}$, λήφθηκε το φάσμα απορρόφησης, έτσι ώστε να βρεθεί το ακριβές μήκος κύματος που λαμβάνουμε την μέγιστη απορρόφηση. Το μήκος κύματος λοιπόν, που εμφανίζει την μέγιστη απορρόφηση η EGCG, είναι τα 273 nm .

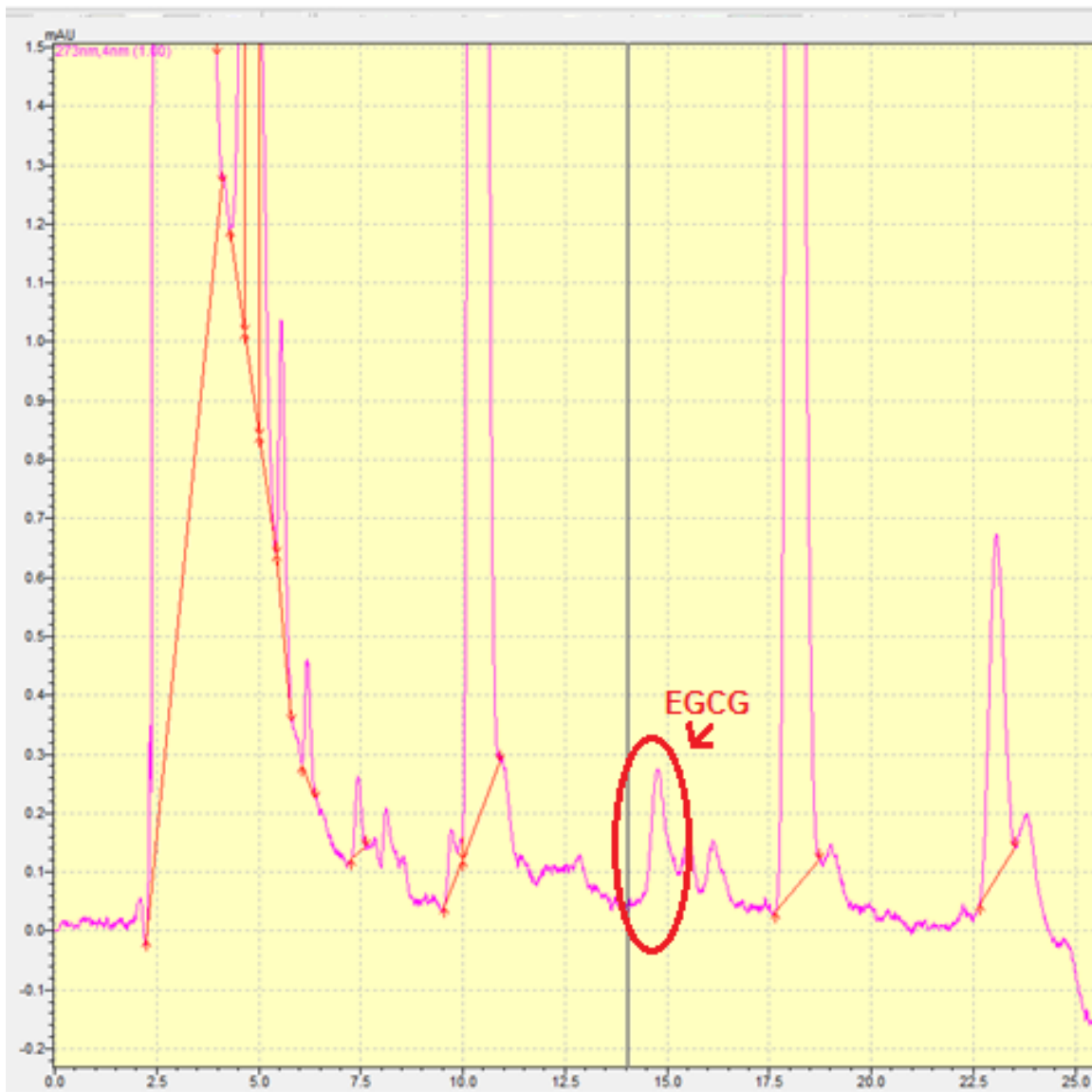
Εκχυλιστικό μέσο

Πραγματοποιώντας εκχυλίσεις με τα διαλύματα 1) μίγμα μεθανόλη:οξικός αιθυλεστερας και 2) οξικός αιθυλεστερας, σε δείγματα πλάσματος, βρέθηκε καλύτερη ανάκτηση της EGCG στην περίπτωση του οξικού αιθυλεστερα, αφού το εμβαδόν της κορυφής που μελετήθηκε στην ίδια συγκέντρωση προτύπου ήταν μεγαλύτερο. Ακόμα, μία παρατήρηση, όσον αφορά τις παραπάνω δοκιμές είναι, ότι κατά τις εκχυλίσεις με το διάλυμα 1, ο διαχωρισμός οργανικής με υδατική φάση δεν ήταν τόσο ξεκάθαρος, όσο κατά την διαδικασία των εκχυλίσεων με τον διαλύτη 2-οξικός αιθυλεστερας.

Ανάλυση του μίγματος ενζύμων

Για την επιβεβαίωση ότι το μίγμα των ενζύμων είναι απαλλαγμένο από EGCG, πραγματοποιήθηκε χρωματογραφική ανάλυση, ύστερα από την εκχύλιση αυτού σύμφωνα με την διαδικασία της υπο-ενότητας B.7.1, με την παραλλαγή, ότι τα 120μl αποτελούν διάλυμα ρυθμιστικού οξικού οξέος και τα 10μl διάλυμα μίγματος ενζύμων.

Το χρωματογράφημα, έδειξε ότι το διάλυμα του μίγματος ενζύμων δεν εμφάνισε κάποια κορυφή στον χρόνο όπου αναμένεται η EGCG ($15,5 \pm 0,5 \text{ min}$). Επομένως, το διάλυμα των ενζύμων είναι απαλλαγμένο από την ουσία προς μελέτη-EGCG.



Εικόνα Γ.1.1 Χρωματογράφημα δείγματος από πλάσμα ποντικού εμβολιασμένο με ποσότητα EGCG τελικής συγκέντρωσης 166 μ g/l. Με τις εξής συνθήκες HPLC: ροή 1 ml/min, βαθμιδωτό πρόγραμμα κινητής Διαλύματος A (υδατικό διάλυμα με φωσφορικό οξύ και ακετονιτρίλιο σε αναλογία 84,9: 0,1:15%v/v, αντίστοιχα) και διαλύματος B(Νερό:Ακετονιτρίλιο,5:95%v/v). (άξονας x: ο χρόνος, άξονας y: απορρόφηση, μήκος κύματος:273nm).

Γ.2 Ορθότητα, Γραμμικότητα, Ακρίβεια

Γ.2.1 Ανάκτηση EGCG στο πλάσμα

Όπως φαίνεται και στον **πίνακα Γ.2.1**, η μέση τιμή ανάκτησης από τις συγκεντρώσεις 44,83,122μg/L είναι $84,37 \pm 1,75\%$, $97,28 \pm 6,91\%$ και $70,92 \pm 3,02\%$, αντίστοιχα (μέσος όρος \pm σχετική τυπική απόκλιση για $n=3$). Τα αποτελέσματα, αυτά, δείχνουν, ότι η διαδικασία των εκχυλίσεων, έχει ως αποτέλεσμα, μία αποδεκτή και καλή ανάκτηση της EGCG από την μήτρα του πλάσματος. Επομένως, οι συγκεντρώσεις που μετρούνται στα δείγματα πλάσματος των ομάδων, βρίσκονται πολύ κοντά στις πραγματικές τιμές, βάσει των πρότυπων υδατικών διαλυμάτων.

Γ.2.2 Γραμμικότητα καμπύλης

Η καμπύλη αναφοράς της EGCG στο πλάσμα ποντικών, έδειξε μία, αρκετά καλή γραμμικότητα με $R^2=0,9903$, (**Εικόνα Γ.2.1**), σε ένα εύρος συγκεντρώσεων, από 44 με 500 μg/L.

Επίσης, κατασκευάστηκε, διάγραμμα συγκέντρωσης συναρτήσεως του εμβαδού της κορυφής (Area), για τα υδατικά διαλύματα EGCG, στο οποίο, φάνηκε επίσης πολύ καλή γραμμικότητα ($R^2=0,999$), στο ίδιο εύρος συγκεντρώσεων που εξετάστηκε στο πλάσμα. (**Εικόνα Γ.2.2**).

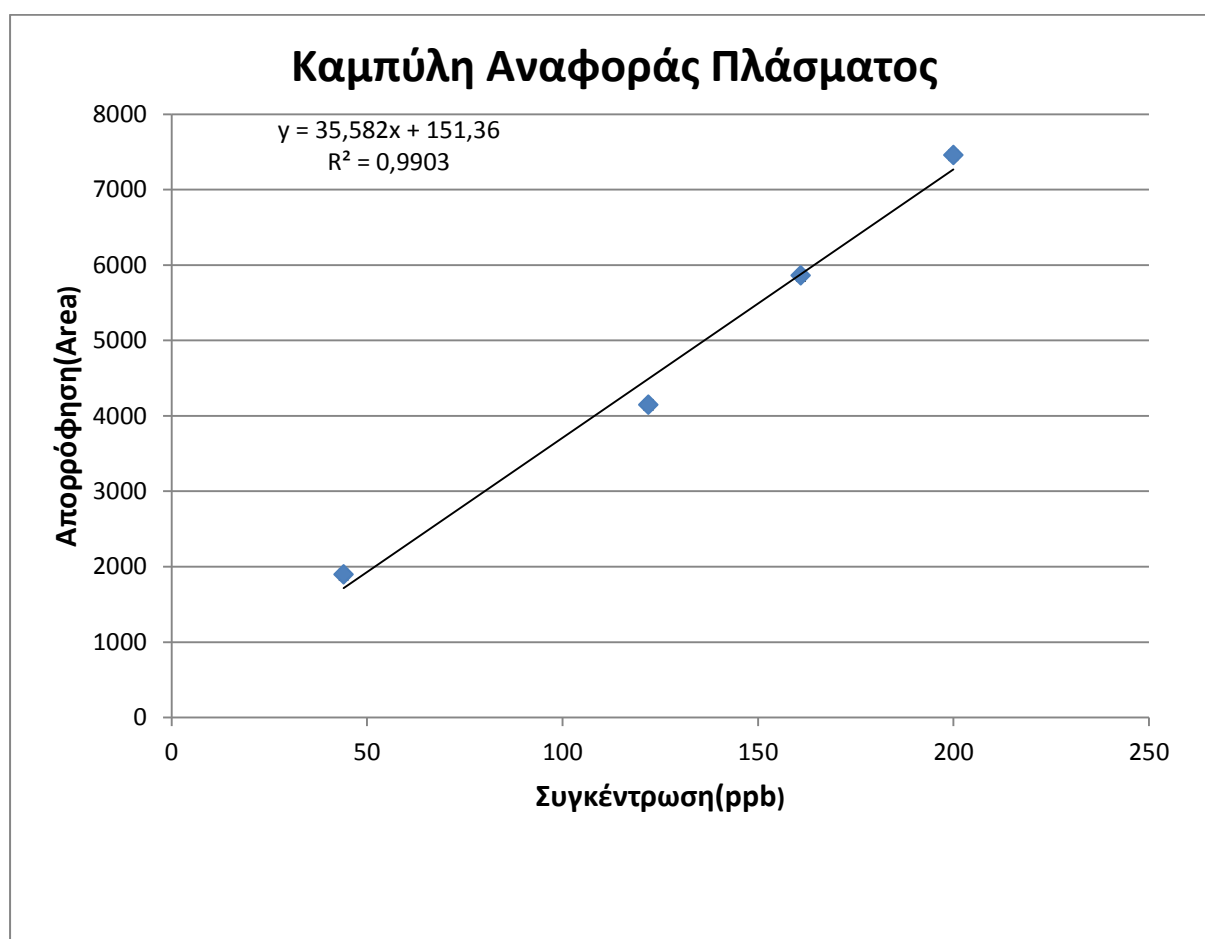
Η επιλογή των κατάλληλων συγκεντρώσεων, για την κατασκευή των πρότυπων καμπυλών, καθώς οι τιμές που επιλέχθηκαν (44,83,122 μg/L), για να εξεταστούν η ακρίβεια και η ορθότητα των εκχυλίσεων του πλάσματος, έγινε βάσει των αναμενόμενων τιμών EGCG, σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Dube et al. 2011a). Σύμφωνα με τα παραπάνω, παρατηρούμε μία ικανοποιητική γραμμικότητα της σχέσης μεταξύ συγκέντρωσης και εμβαδού της κορυφής (EGCG), στα πρότυπα υδατικά διαλύματα (**Εικόνα Γ.2.3**), καθώς και στα εκχυλίσματα των προτύπων στο πλάσμα (**Εικόνα Γ.2.4**).

Ακόμα, όπως φαίνεται και στον **πίνακα Γ.2.1**, η ανάκτηση της EGCG στο εκχύλισμα του πλάσματος, πραγματοποιείται σε ένα μεγάλο ποσοστό, όπως φαίνεται και πιο καθαρά στην στήλη μετρούμενης συγκέντρωσης, συγκριτικά με την θεωρητική συγκέντρωση.

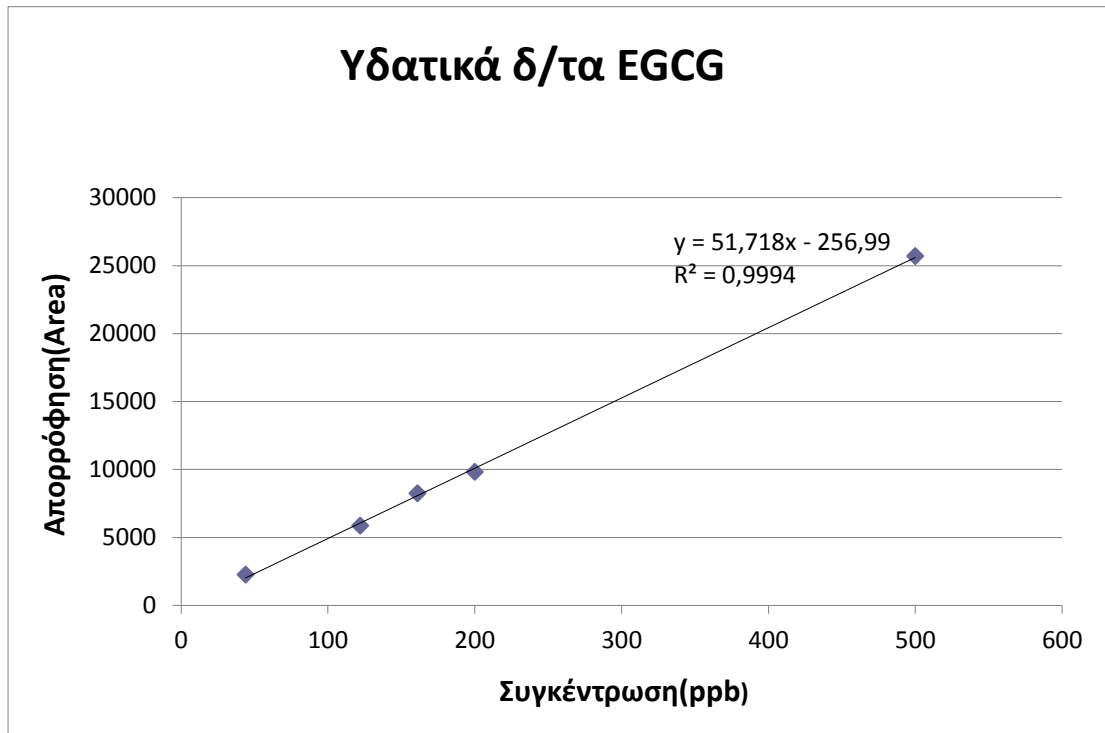
Τελικά, λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω αποτελέσματα, αποδεικνύεται, ότι οι αναλύσεις της EGCG ύστερα από την εκχύλιση του πλάσματος, είναι αξιόπιστες για την ποσοτικοποίηση της EGCG στο βιολογικό δείγμα του πλάσματος.

	Συγκέντρωση Θεωρητική (μg/L)	Συγκέντρωση Μετρούμενη (μg/L)	Σχετική τυπική απόκλιση (%)	Ανάκτηση (ή ορθότητα) (%)
Διαδοχικές Ημέρες	44	41,61	1,75	84,37
	83	80,88	6,91	97,28
	122	85,14	3,02	70,92

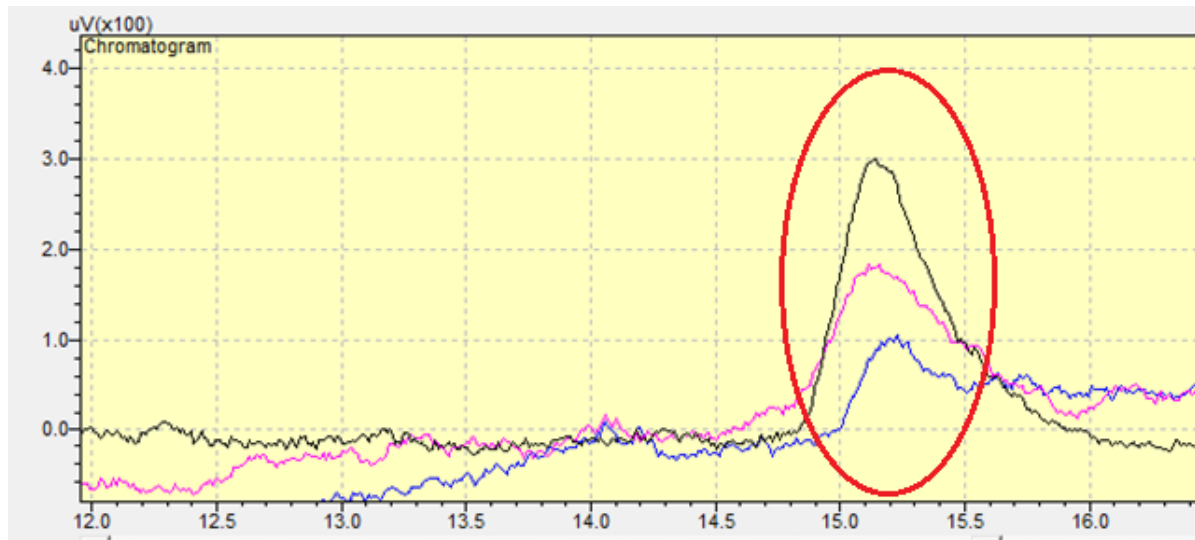
Πίνακας Γ.2.1 Παρουσίαση των τιμών, ανάκτησης και σχετικής τυπικής απόκλισης στις αναλύσεις ποσοτικοποίησης της EGCG στο πλάσμα ποντικών.



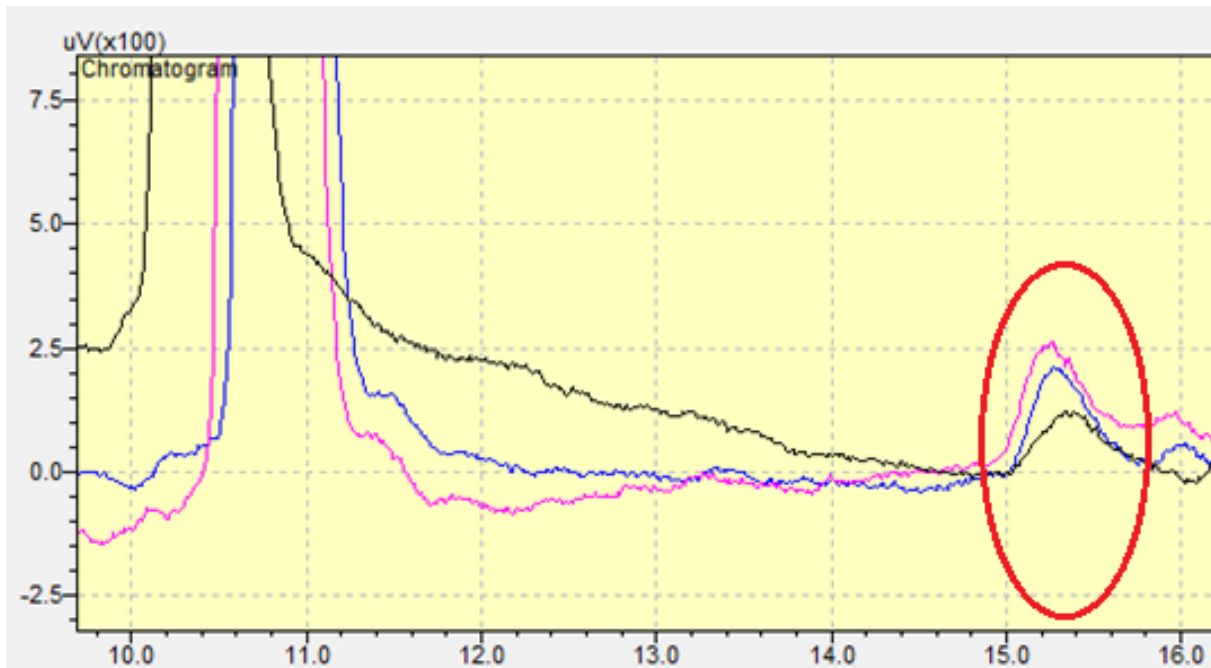
Εικόνα Γ.2.1 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς, στο πλάσμα ποντικών, $R^2 = 0,9903$. Η κάθε συγκέντρωση που επιλέχθηκε για την κατασκευή του διαγράμματος, αναλύθηκε 3 φορές και στο διάγραμμα φαίνεται ο μέσος όρος, της κάθε συγκέντρωσης.



Εικόνα Γ.2.2 Πρότυπη καμπύλη σε υδατικά διαλύματα EGCG, $R^2 = 0,9994$. Η κάθε συγκέντρωση που επιλέχθηκε για την κατασκευή του διαγράμματος, αναλύθηκε 3 φορές και στο διάγραμμα φαίνεται ο μέσος όρος της κάθε συγκέντρωσης.



Εικόνα Γ.2.3 Σύγκριση των χρωματογραφημάτων των υδατικών προτύπων EGCG, συγκεντρώσεων: **μπλε** 44µg/L, **ροζ**:83 µg/L, **μαύρο**:200 µg/L. (άξονας x: χρόνος, άξονας y: απορρόφηση, μήκος κύματος:273nm).



Εικόνα Γ.2.4 Σύγκριση των χρωματογραφημάτων των προτύπων EGCG σε πλάσμα ποντικίου, τριών ενδεικτικών συγκεντρώσεων: **ροζ**:200 µg/L, **μπλε** 161 µg/L, **μαύρο**:83 µg/L. (άξονας x: χρόνος, άξονας y: απορρόφηση, μήκος κύματος:273nm).

Γ.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης EGCG στο πλάσμα

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων στις 4 ομάδες ποντικών, έδειξαν να υπάρχει ποσότητα EGCG στις ομάδες B (νανογαλάκτωμα EGCG), C (Υδατικό διάλυμα EGCG) και D (EGCG σε νερό:λάδι(80:20%)), ενώ, στην ομάδα A, η οποία αποτελούσε την ομάδα ελέγχου δεν εμφανίστηκε κάποια κορυφή, στο συγκεκριμένο χρόνο εμφάνισης της EGCG, στο χρωματογράφημα. (**Εικόνα Γ.3.1**)

Ο μέσος όρος, συγκέντρωσης της EGCG, από τα 5 ποντίκια της κάθε ομάδας παρουσιάζεται στον **πίνακα Γ.3.1**. Όπως φαίνεται στον πίνακα Γ.3.1, την μεγαλύτερη συγκέντρωση EGCG την εμφανίζει η ομάδα ποντικών στην οποία είχε γίνει χορήγηση της ουσίας EGCG σε μίγμα νερού με λάδι, περιεκτικότητας 80:20%, αντίστοιχα.

Σύμφωνα με την ανεξάρτητων μεταβλητών, μη παραμετρική στατιστική μέθοδο Kruskal-Wallis, εμφανίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών συγκέντρωσης EGCG, των 4 ομάδων ποντικών (ομάδα ελέγχου, B, C, D), ($P=0,013<0,05$).

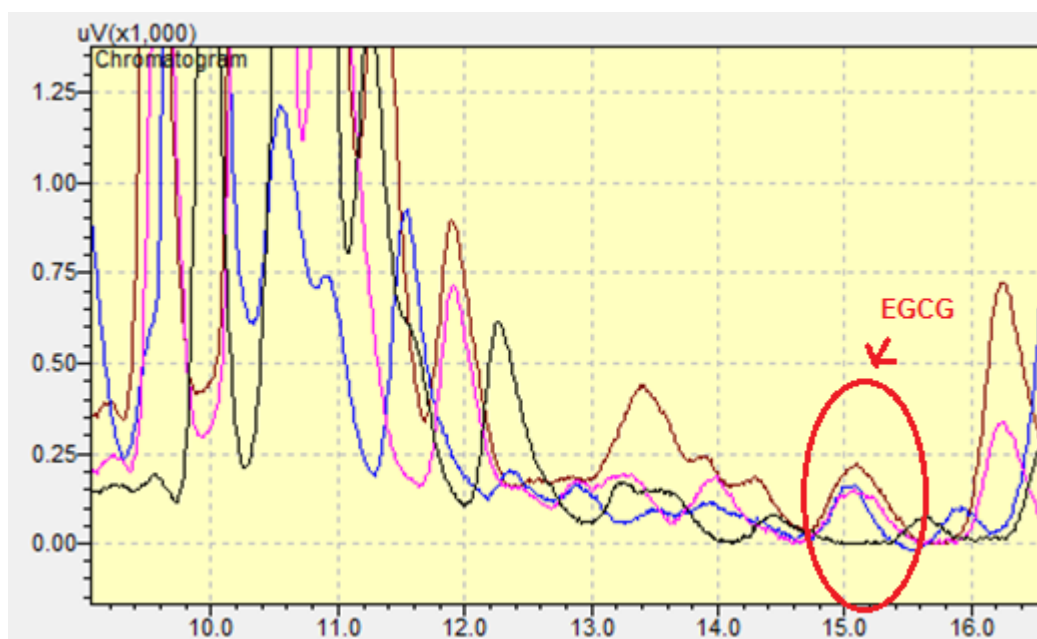
Η διαφορά της τιμής συγκέντρωσης της EGCG, μεταξύ της ομάδας C (Υδατικό διάλυμα EGCG) και της ομάδας B (νανογαλάκτωμα EGCG), δεν θεωρείται στατιστικά σημαντική ($P>0,05$). Παρόλα αυτά, η διαφορά στην τιμή της συγκέντρωσης EGCG, είναι 6,68%, με μεγαλύτερη την τιμή συγκέντρωσης EGCG του μέσου όρου, της ομάδας νανογαλακτώματος της EGCG.

Η διαφορά της τιμής συγκέντρωσης της EGCG, μεταξύ της ομάδας B (νανογαλάκτωμα EGCG και της ομάδας D (EGCG σε νερό:λάδι(80:20%)), όπως και στην σύγκριση των προηγούμενων δύο ομάδων, δεν θεωρείται στατιστικά σημαντική ($P>0,05$). Όμως, εμφανίζεται μεγαλύτερη διαφορά στην τιμή της συγκέντρωσης EGCG, της τάξης του 20,86%, με μεγαλύτερη την τιμή συγκέντρωσης EGCG του μέσου όρου, της ομάδας EGCG σε νερό:λάδι(80:20%).

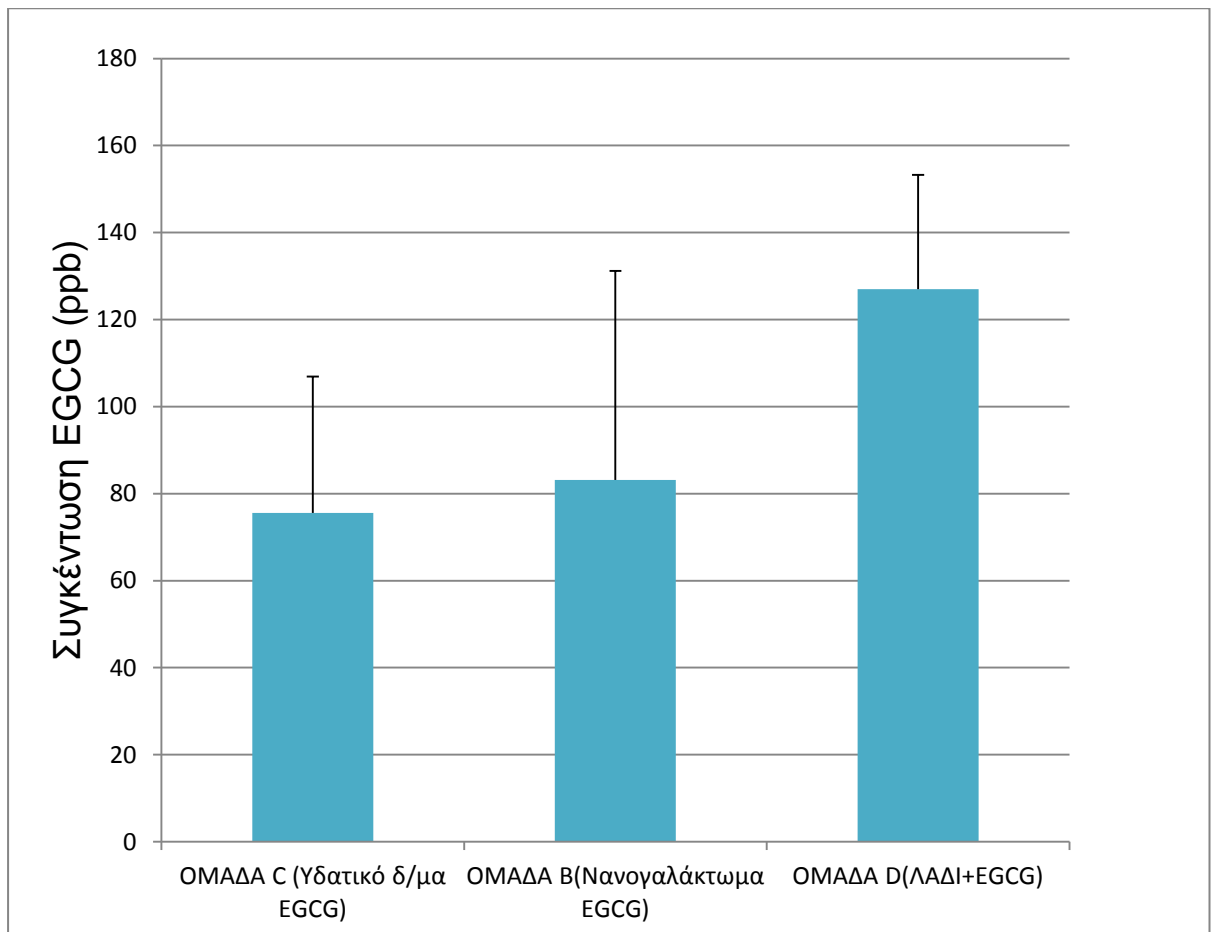
Σύμφωνα με την στατιστική μέθοδο, η τιμή P της ομάδας C με την ομάδα D, βρίσκεται πολύ κοντά στο όριο, για να θεωρηθεί στατιστικά σημαντική ($P=0,083$). Αυτό φαίνεται και στην διαφορά της συγκέντρωσης EGCG που υπάρχει μεταξύ τους, αφού η ομάδα D (EGCG σε νερό:λάδι(80:20%)), έχει κατά 25,40%, μεγαλύτερη τιμή μέσου όρου συγκέντρωσης EGCG σε σχέση με την ομάδα C (υδατικό διάλυμα EGCG). **(Εικόνα Γ.3.2)**

	Συγκέντρωση EGCG (μέσος όρος (μg/L))	Σχετική Τυπική Απόκλιση(%)
ΟΜΑΔΑ Β (νανογαλάκτωμα EGCG)	83,14	57,82
ΟΜΑΔΑ C (Υδατικό διάλυμα EGCG)	75,54	41,50
ΟΜΑΔΑ D (Λάδι με EGCG)	126,98	20,70

Πίνακας Γ.3.1 Μέσος όρος συγκεντρώσεων ανά ομάδα ποντικών(5 ποντίκια σε κάθε ομάδα), παρέμβασης και οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις.



Εικόνα Γ.3.1 Σύγκριση των χρωματογραφημάτων των 4 ομάδων ποντικών, στον χρόνο εμφάνισης ($15,5 \pm 0,5 \text{ min}$) της EGCG. Μαύρο: ομάδα ελέγχου, ροζ: ομάδα Β, μπλε: ομάδα C, καφέ: ομάδα D. (άξονας x: χρόνος, άξονας y: απορρόφηση, Μήκος κύματος: 273nm).



Εικόνα Γ.3.2 Απεικόνιση σε ράβδους του μέσου όρου των συγκεντρώσεων ανά ομάδα ποντικών (5 ποντίκια σε κάθε ομάδα), παρέμβασης με τις σχετικές τυπικές αποκλίσεις τους. Η ομάδα C με την ομάδα B, όπως και η B με την D, ανά ζεύγη, δεν θεωρούνται στατιστικά σημαντικές οι διαφορές τους ($P > 0,05$). Ωστόσο, η τιμή P της ομάδας C με την ομάδα D, βρίσκεται πολύ κοντά στο όριο για να θεωρηθεί στατιστικά σημαντική ($P = 0,083$). Με όριο σημαντικότητας $P = 0,05$.

Δ. Συζήτηση

Στο πρώτο στάδιο, εύρεσης του κατάλληλου διαλύτη, για την χρήση του στις αναλύσεις των ομάδων ποντικών, φάνηκε το καλύτερο αποτέλεσμα να έχει το υδατικό διάλυμα με φωσφορικό οξύ και ακετονιτρίλιο σε αναλογία 84,9: 0,1:15%v/v, αντίστοιχα. Οι κορυφές που εμφανίζονταν στις συγκεκριμένες συνθήκες δεν εμφανίζαν ουρές, και μπορούσαν να ποσοτικοποιηθούν. Αντίθετα, τα διαλύματα της κινητής φάσης που αναφέρονται στην βιβλιογραφία, υδατικό διάλυμα 0,1% κιτρικού οξέος και ακετονιτρίλιο(86:14)(Fu et al. 2008), υδατικό διάλυμα 1% οξικού οξέος και ακετονιτρίλιο(87,5:12,5)(Dube et al. 2011a), δεν έδειξαν ικανοποιητικό αποτέλεσμα στην μορφή της κορυφής, έτσι ώστε να μπορεί να ποσοτικοποιηθεί, διότι εμφανιζόταν, πολύ κοντά στον θόρυβο του οργάνου. Η διαφορά αυτή στα αποτελέσματα, πιθανόν να οφείλεται, στη χρήση ανιχνευτή HPLC-UV, ο οποίος έχει μεγαλύτερη ευαισθησία στο υπεριώδες φάσμα, από ότι ο ανιχνευτής συστοιχίας διόδων. Επίσης, η καλύτερη μορφή της κορυφής, στον επιλεγμένο διαλύτη, μπορεί να οφείλεται και στο είδος καθώς και τη σύσταση του οξέος που χρησιμοποιήθηκε. Το οξύ στον διαλύτη στις αναλύσεις της HPLC, προστίθεται για δύο λόγους. Αρχικά, το οξύ παρέχει πρωτόνια τα οποία αλληλεπιδρούν άλλοτε με την ουσία και άλλοτε με τα μόρια της διαχωριστικής στήλης, συγκεκριμένα της στήλης αντίστροφης φάσης C18, επομένως έτσι, αλλάζει ο βαθμός ιονισμού της EGCG και επηρεάζεται η υδροφοβικότητά της(Crawford Scientific n.d.). Επίσης, κάποια οξέα, όπως το οξικό και το κιτρικό οξύ (που χρησιμοποιήθηκαν στην εύρεση της βέλτιστης κινητής φάσης) απορροφούν σε μεγαλύτερα μήκη κύματος συγκριτικά με το φωσφορικό και επηρεάζουν την ευαισθησία του ανιχνευτή, συγκεκριμένα μειώνουν την ευαισθησία του.

Για αναλύσεις του πλάσματος, αρχικά, πραγματοποιείται επώαση του πλάσματος με μίγμα ενζύμων (σουλφατάση και γλυκουρονιδάση). Το μίγμα αυτό, αναλύθηκε ξεχωριστά, με την μέθοδο της HPLC και δεν βρέθηκε να υπάρχει πρόσμιξη με ουσία EGCG, όπου θα μπορούσε να είχε επηρεάσει τα αποτελέσματα των αναλύσεων στις ομάδες προς εξέταση.

Ύστερα από την επώαση, πραγματοποιούνται εκχυλίσεις του πλάσματος, έτσι ώστε να απομονωθεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα της ουσίας EGCG, στο πλάσμα των ποντικών στις 4 ομάδες (ελέγχου, νανογαλακτώματος EGCG, υδατική EGCG και

μίγματος λαδιού-νερού EGCG), με τις λιγότερες προσμίξεις από άλλες ουσίες.

Όσον αφορά, το εκχυλιστικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε, δηλαδή, ο οξικός αιθυλεστέρας, χρησιμοποιείται ευρέως στην βιβλιογραφία (Fu et al. 2008; Dube et al. 2011a; Lambert et al. 2003) και στην συγκεκριμένη μελέτη, θεωρήθηκε ο κατάλληλος για την εκχύλιση της μέγιστης δυνατής ποσότητας ουσίας EGCG από το πλάσμα των ποντικών, σε σχέση με την δοκιμή που πραγματοποιήθηκε με το μίγμα μεθανόλης-οξικού αιθυλεστέρα. Η μη ικανοποιητική εκχύλιση της EGCG, ύστερα από την δοκιμή μίγματος μεθανόλης-οξικού αιθυλεστέρα, που φαίνεται στην βιβλιογραφία (Pauli et al. 2014) να είναι πιο αποτελεσματική, πιθανόν, να οφείλεται στο είδος του βιολογικού δείγματος (πλάσμα) που αναλύεται, διότι η μελέτη του Pauli, αναφέρεται σε εκχύλιση φύλλων και όχι σε βιολογικά υγρά.

Στο δεύτερο στάδιο επικύρωσης της μεθόδου HPLC, παρατηρείται μια ικανοποιητική ανάκτηση της ουσίας EGCG στο πλάσμα, ύστερα από τις εκχυλίσεις, σε σχέση με τις πραγματικές τιμές των υδατικών προτύπων που αναλύθηκαν απευθείας. Οι συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν για τον έλεγχο της ανάκτησης ήταν οι 44,83,122μg/L και ανάκτηση, $84,37 \pm 1,75\%$, $97,28 \pm 6,91\%$ και $70,92 \pm 3,02\%$, αντίστοιχα. Η επιλογή των συγκεντρώσεων αυτών, έγινε διότι σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Dube et al. 2011a; Lambert et al. 2003; Lee et al. 2002) αποτελούν το εύρος των συγκεντρώσεων, στο οποίο περιμένουμε να δούμε την ουσία EGCG στις ομάδες παρέμβασης. Ο βαθμός ανάκτησης, της EGCG, βρίσκεται σε συμφωνία με τις παρόμοιες μελέτες της βιβλιογραφίας, που έχουν αναφερθεί.

Η γραμμικότητα της καμπύλης αναφοράς, αρχικά στα πρότυπα των υδατικών διαλυμάτων EGCG, έδειξε να είναι πολύ καλή με $R^2=0,999$, πράγμα που σημαίνει ότι η συγκέντρωση της ουσίας EGCG σε σχέση με το εμβαδόν που λαμβάνεται από το χρωματογράφημα είναι ποσά ανάλογα.

Επίσης, καλή γραμμικότητα φαίνεται να υπάρχει και στην καμπύλη αναφοράς που κατασκευάστηκε στο πλάσμα με πρότυπα EGCG, $R^2=0,9903$, επιβεβαιώνοντας με αυτόν τον τρόπο και την καλή ανάκτηση που συζητήθηκε νωρίτερα. Η καμπύλη αναφοράς στο πλάσμα ποντικών χρησιμοποιείται, για την ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης στις ομάδες των ποντικών παρέμβασης.

Τελικά, λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω αποτελέσματα, αποδεικνύεται, ότι οι αναλύσεις της EGCG ύστερα από την εκχύλιση του πλάσματος, στις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν, είναι αξιόπιστες για την ποσοτικοποίηση της EGCG στο βιολογικό δείγμα πλάσματος των ομάδων των ποντικών.

Στο τελευταίο κομμάτι της μελέτης, πραγματοποιήθηκαν οι αναλύσεις στα πλάσματα, των 3 ομάδων παρέμβασης και μίας ομάδας ελέγχου ποντικών. Οι 3 ομάδες παρέμβασης ήταν: Ομάδα Β (νανογαλάκτωμα της EGCG), Ομάδα C(υδατικό διάλυμα της EGCG) και ομάδα D(EGCG σε νερό:λάδι(80:20%).

Τα αποτελέσματα από τις αναλύσεις HPLC, όσον αφορά την συγκέντρωση της EGCG, συνολικά έδειξαν να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων ($P < 0,05$), ωστόσο δεν φάνηκε να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων παρέμβασης.

Συγκεκριμένα, στην ομάδα Α (ελέγχου), δεν εμφανίστηκε κορυφή EGCG, στον αναμενόμενο χρόνο εμφάνισής της, αποτέλεσμα, το οποίο ήταν επόμενο, από την στιγμή που δεν είχε γίνει παρέμβαση, και η τροφή των ποντικών δεν περιλάμβανε την ουσία EGCG. Η ομάδα Β, με το νανογαλάκτωμα της EGCG, δείχνει να έχει μεγαλύτερη τιμή συγκέντρωσης, από την ομάδα C, υδατικής EGCG (της τάξης του 6,68%), με τιμές συγκέντρωσης EGCG του μέσου όρου των 5 ποντικών $83,14 \pm 57,82$ $\mu\text{g/L}$ και $75,54 \pm 41,50$ $\mu\text{g/L}$ (\pm σχετική τυπική απόκλιση), αντίστοιχα.

Ωστόσο, η ομάδα D, EGCG σε νερό:λάδι(80:20%), εμφανίζει τις πιο υψηλές τιμές στη συγκέντρωση της EGCG, $126,98 \pm 20,7$ $\mu\text{g/L}$ και σύμφωνα με τα στατιστικά αγγίζει το όριο για να θεωρηθεί στατιστικά σημαντική η διαφορά της με την ομάδα C, υδατικής EGCG, (της τάξης του 20,86%,) με $P=0,083$.

Η ομάδα Β, του νανογαλακτώματος EGCG, αν και εμφάνισε σαν μέσο όρο συγκέντρωσης EGCG, τιμή μεγαλύτερη από την ομάδα C, της υδατικής EGCG, ωστόσο, η σχετική τυπική απόκλιση είναι αρκετά μεγάλη 57,82%.

Επομένως, τα αποτελέσματα έρχονται σε αντίθεση με τις μελέτες, οι οποίες εξετάζουν νανοδομές EGCG και το αποτέλεσμα της βιοδιαθεσιμότητας της. Σύμφωνα με την μελέτη των (Hu et al. 2013), τα νανοσωματίδια CS-CPP(βιοδραστικά μόρια πολυσακχαρίτων και πεπτιδίων), ενθυλακώνουν και

προστατεύουν με επιτυχία την EGCG, από τις συζεύξεις της με διάφορα άλλα μόρια του μεταβολισμού και επίσης, διατηρούν της σταθερότητά της. Επίσης, η μελέτη του (Dube et al. 2011b), με μία διαφορετική μορφή νανοσωματιδίου από την μελέτη του Hu, την, CS NP, έδειξε να αυξάνει σημαντικά την συγκέντρωση της EGCG στο πλάσμα των ποντικών, ύστερα από στοματική χορήγηση, γεγονός που αποδόθηκε στην σταθερότητα που παρέχουν οι συγκεκριμένες δομές νανοσωματιδίων.

Οι διαφορές στα αποτελέσματα που υπάρχουν μεταξύ της συγκεκριμένης μελέτης και της βιβλιογραφίας, που αφορά τα νανοσωματίδια, πιθανόν να οφείλεται στην συγκεκριμένη δομή του νανογαλακτώματος. Ακόμη μία διαφορά, που υπάρχει σε σχέση με τις υπόλοιπες μελέτες, είναι ο χρόνος διεξαγωγής του πειράματος. Στη μελέτη μας, τα ποντίκια, θανατώθηκαν, ύστερα από 2 ώρες μετά την κάθε είδους παρέμβαση, ενώ, οι υπόλοιπες μελέτες πραγματοποίησαν φαρμακοκινητικές αναλύσεις τουλάχιστον 6 ώρες, μελετώντας την πορεία της συγκέντρωσης της EGCG, στο χρόνο. Συγκεκριμένα, στην μελέτη των (Dube et al. 2011b), ενδιαφέρον αποτελέσματα, αποτελεί, ότι στις αναλύσεις πλάσματος των ποντικών της ομάδας παρέμβασης της ενθυλακωμένης EGCG σε νανοσωματίδιο CS, φάνηκε, στο χρόνο 1,5 ώρας να μην υπάρχει διαφορά μεταξύ της συγκέντρωσης EGCG της ομάδας με την ενθυλακωμένη EGCG και της ομάδας με την υδατική EGCG. Αυτό, αποδεικνύει ότι το συγκεκριμένο είδος νανοσωματιδίου έχει αυξήσει την έκθεση του πλάσματος σε EGCG, ωστόσο, αυτό είναι αποτέλεσμα της σταθερότητας που της παρέχει και όχι της αύξησης της απορρόφησης της στα κύτταρα.

Όσον αφορά, τις τελικές συγκεντρώσεις EGCG που ανιχνεύονται στις ομάδες, συγκρίνοντας με τις προγενέστερες σχετικές μελέτες σε ποντίκια, φαίνεται η συγκεκριμένη μελέτη να βρίσκεται κοντά στις αναμενόμενες τιμές, όσον αφορά την τάξη μεγέθους των $\mu\text{g/L}(\text{ppb})$, σύμφωνα και με την αρχική ποσότητα χορήγησης της EGCG, $0,76\text{mg/kg}$ (Dube et al. 2011a), εμφανίζοντας, λίγο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, με μόνη σημαντική διαφορά το μέσο όρο συγκέντρωσης EGCG της ομάδας D(EGCG σε νερό:λάδι(80:20%)),

Ενδιαφέρον αποτελεί, ότι, στις μελέτες στις οποίες έγινε χορήγηση 100 φορές μεγαλύτερης ποσότητας EGCG αρχικά, στα ποντίκια(Lambert et al. 2003; Lambert et al. 2004), τα αποτελέσματα τελικά των συγκεντρώσεων EGCG, του πλάσματος των ποντικών, έδειξαν να βρίσκονται στην ίδια τάξη μεγέθους (ppb) με την

συγκεκριμένη μελέτη που πραγματοποιήσαμε. Η μη ανάλογη συμπεριφορά μεταξύ αρχικής δόσης χορήγησης και τελικής συγκέντρωσης στο πλάσμα, πιθανόν να οφείλεται στην χαμηλή σταθερότητα της EGCG στον οργανισμό και στην μειωμένη ικανότητα διαπερατότητας αυτής, όσον αφορά, την εισαγωγή της στα κύτταρα.

Σημαντικό αναφοράς και ανάλυσης, αποτελεί το αποτέλεσμα που εμφανίζεται στην ομάδα παρέμβασης D, EGCG σε νερό:λάδι(80:20%), αφού εμφανίζει τις υψηλότερες τιμές συγκέντρωσης EGCG (μέσος όρος: $126,98 \pm 20,7$ $\mu\text{g/L}$), από τις υπόλοιπες ομάδες, καθώς και αυξημένη συγκέντρωση συγκριτικά με τα αποτελέσματα των άλλων μελετών που ήδη έχουν αναφερθεί (η μέγιστη συγκέντρωση EGCG από την μελέτη των (Dube et al. 2011a), είναι $15,7$ $\mu\text{g/L}$). Όπως φαίνεται, το λάδι, έχει την ικανότητα να αυξάνει την βιοδιαθεσιμότητα της EGCG στον οργανισμό των ποντικών με αποτέλεσμα να ανιχνεύεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις η EGCG. Μία πιθανή εξήγηση του φαινομένου αυτού, αποτελεί η ιδιότητα του ελαιολάδου να αλληλεπιδρά με την κυτταρική μεμβράνη. Δηλαδή, έχει φανεί ότι οι φωσφολιπιδικές ακυλο-αλυσίδες του ελαιολάδου, επάγουν την έντονη διαταραχή της επιφάνειας της μεμβράνης, αφού ενώνεται με τα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια. Τα φαινορικά, του ελαιολάδου με την σειρά τους, παραμένουν στην επιφάνεια της λιπιδική κυτταρική μεμβράνη, σχεδόν παράλληλα της διπλοστοιβάδας, στην οποία δεν εισχωρούν και δημιουργείται ένα μεμβρανικό δυναμικό από τα φαινορικά, με αποτέλεσμα να κατευθύνουν και να καθυστερούν την λιπιδική υπεροξειδωση, εγκλωβίζοντας τις ρίζες που προέρχονται από την υδατική φάση και προλαμβάνουν την διάδοση της λιπιδικής υπεροξειδωσης, αλληλεπιδρώντας με την εσωτερική μεμβράνη. Το παραπάνω φαινόμενο φαίνεται να λειτουργεί συνεργιστικά με τις υπόλοιπες πολυφαινόλες και άλλα αντιοξειδωτικά κατά του οξειδωτικού στρες στις μεμβράνες.

Κατ' αυτόν τον τρόπο, είναι πιθανό να προστατεύεται η EGCG από την αυτοοξειδωση της, προφυλάσσοντας αυτή, τα φαινορικά της μήτρας του ελαιολάδου (Lopez et al. 2014). Επίσης, τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής ικανότητας στα δείγματα της ομάδας D των πλασμάτων, έδειξαν, υψηλή τιμή αντιοξειδωτικής δράσης και στατιστικά σημαντική, συγκριτικά με τις υπόλοιπες ομάδες παρέμβασης, γεγονός που πιθανόν, εξηγείται με τον παραπάνω συνεργιστικό μηχανισμό και με αυτόν τον τρόπο τον επιβεβαιώνει.

Το αποτέλεσμα της προσθήκης ελαιολάδου ,ως μήτρα, κατά την διάρκεια της επεξεργασίας σάλτσας ντομάτας, στη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών της ντομάτας, εξέτασε, η πιλοτική, διασταυρούμενη, τυχαιοποιημένη μελέτη, 5 ανδρών των (Tulipani et al. 2012). Τα αποτελέσματά της, έδειξαν ότι συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις του πλάσματος με τον χρόνο χορήγησης, παρατηρήθηκε μία διφασική απορρόφηση, στο δείγμα που ήταν εμπλουτισμένο με ελαιόλαδο (πρώτη κορυφή στα 30 λεπτά και δεύτερη στις 4 με 5 ώρες). Αυτά τα ευρήματα, δείχνουν την ύπαρξη μιας επαναπορρόφησης των πολυφαινολών από την εντεροηπατική κυκλοφορία. Οι πολυφαινόλες, υφίστανται ανακύκλωση μέσω του πεπτικού συστήματος, εξαιτίας της εντεροηπατικής και εντερικής ανακύκλωσης, με αποτέλεσμα να τους προσδίδεται μεγαλύτερη διάρκεια χρόνου ημίσειας ζωής. Η επέκταση του χρόνου ημίσειας ζωής, επιτρέπει στις πολυφαινόλες να δράσουν, αφού και οι συζευγμένες μορφές τους είναι βιοδραστικές, διότι μπορούν να υδρολυθούν από τα ένζυμα των ιστών και να επανέλθουν στην δραστική ασύζευκτη τους αρχική μορφή.(Tulipani et al. 2012). Ωστόσο, για την επιβεβαίωση του φαινομένου αυτού είναι απαραίτητη, η διεξαγωγή μελετών σε μεγαλύτερη κλίμακα.

Ε. Συμπεράσματα-Προοπτικές και μελλοντικοί στόχοι

Από τα παραπάνω αποτελέσματα, συμπεραίνουμε τα εξής:

- Οι συνθήκες ανάλυσης HPLC, δείχνουν να υπάρχει γραμμικότητα μεταξύ της απορρόφησης και των συγκεντρώσεων της EGCG, καθώς και καλή ανάκτηση στο πλάσμα.
- Συνολικά η συγκέντρωση EGCG που ανιχνεύεται στο πλάσμα των ομάδων παρέμβασης (B,C,D), είναι ελάχιστα μεγαλύτερη από τις αναμενόμενες τιμές της βιβλιογραφίας, με σημαντικά μεγαλύτερη την τιμή συγκέντρωσης EGCG της ομάδας D.
- Αν και φαίνεται να υπάρχει μεγαλύτερη συγκέντρωση της EGCG, στο πλάσμα της ομάδας B (EGCG σε νανοσωματίδιο), από ότι στην ομάδα C (υδατικό διάλυμα EGCG), ωστόσο, είναι ελάχιστη η διαφορά και δεν θεωρείται στατιστικά σημαντική.
- Παρατηρείται, μεγάλη συγκέντρωση της EGCG στην ομάδα D (EGCG σε νερό:λάδι(80:20%)), στο όριο για να θεωρηθεί στατιστικά σημαντική συγκρινόμενη με την ομάδα C, της υδατικής EGCG. Ταυτόχρονα, τα αποτελέσματα από τις αντιοξειδωτικές μελέτες στα πλάσματα των ομάδων, δείχνουν, αρκετά μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα στην ομάδα D.
- Από την παραπάνω παρατήρηση, συμπεραίνουμε ότι τα ευεργετικά αποτελέσματα των διαιτητικών πολυφαινολών στην υγεία, συνδέονται στενά με την βιοπροσβασιμότητα αυτών από την μήτρα του τροφίμου στο οποίο βρίσκονται και την επακόλουθη τους βιοδιαθεσιμότητά στον οργανισμό.

Βάσει των αποτελεσμάτων, προτεινόμενοι τρόποι διεξαγωγής των μελλοντικών μελετών, αποτελούν:

- ✓ Μελέτη της EGCG, με HPLC και ανιχνευτή φθορισμού, ο οποίος, είναι γνωστό ότι έχει αυξημένη ευαισθησία και έτσι μπορεί να φανεί αρκετά χρηστικός και ακριβής, στην μελέτη μικροποσοτήτων EGCG προς μελέτη.
- ✓ Βελτίωση της μεθόδου απομόνωσης της EGCG από το πλάσμα με σκοπό τα λαμβανόμενα εκχυλίσματα να περιέχουν λιγότερες παρεμποδίσεις από τη μήτρα, οι οποίες δυσχεραίνουν σημαντικά την ανάλυση.

- ✓ Αύξηση του χρόνου μελέτης, ελέγχοντας την πορεία της απορρόφησης αυτής στο χρόνο.
- ✓ Μελέτη της συγκέντρωσης των τυχόν μεταβολικών προϊόντων της EGCG που προκύπτουν και ταυτόχρονα την μελέτη της δράσης αυτών, στην μεταβολική λειτουργία.
- ✓ Εκτενέστερη in vitro και in vivo μελέτη του διαλύματος EGCG σε νερό:λάδι(80:20%), έτσι ώστε να βρεθεί ο μηχανισμός, με τον οποίο αυξάνεται η συγκέντρωση της EGCG στο πλάσμα.

Z. Βιβλιογραφία

- Ahmed, S., Stepp, J.R. & Carrie Gleason, 2007. *Green Tea: The Plants, Processing, Manufacturing and Production*, Crabtree Publishing Company. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123849373000021> [Accessed December 6, 2014].
- Ahuja, S., 2006. Chapter 15 High-pressure liquid chromatography. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 47(06), pp.485–559.
- Anatomy, C., 1953. of the Roman Snail (*Helix* , 57, pp.159–162.
- Arts, I.C.W. & Hollman, P.C.H., 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies 1 – 4. , 81.
- Barras, a. et al., 2009. Formulation and characterization of polyphenol-loaded lipid nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics*, 379, pp.270–277.
- Braicu, C. et al., 2013. The relationship between the structure and biological actions of green tea catechins. *Food Chemistry*, 141(3), pp.3282–3289. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.122>.
- Carrie Gleason, 2007. *The Biography of Tea*, Crabtree Publishing Company.
- Crawford Scientific, The Theory of HPLC Chromatographic Parameters. Available at: [https://www.chem.agilent.com/Library/eseminars/Public/Tips and Tricks of HPLC Separation \(4-12-2011\).pdf](https://www.chem.agilent.com/Library/eseminars/Public/Tips%20and%20Tricks%20of%20HPLC%20Separation%20(4-12-2011).pdf).
- Crichton, G.E. et al., 2013. Mediterranean diet adherence and self-reported psychological functioning in an Australian sample. *Appetite*, 70, pp.53–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23831151> [Accessed May 28, 2014].
- D’Archivio, M. et al., 2010. Bioavailability of the polyphenols: Status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, pp.1321–1342.
- Dube, A., Nicolazzo, J. a. & Larson, I., 2011a. Assessment of plasma concentrations of (-)-epigallocatechin gallate in mice following administration of a dose reflecting consumption of a standard green tea beverage. *Food Chemistry*, 128(1), pp.7–13. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814611002962> [Accessed June 10, 2014].
- Dube, A., Nicolazzo, J. a. & Larson, I., 2011b. Chitosan nanoparticles enhance the plasma exposure of (-)-epigallocatechin gallate in mice through an enhancement in intestinal stability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 44(3), pp.422–426. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2011.09.004>.
- Engelhardt, U.H., 2013. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, Elsevier. Available at:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124095472027840> [Accessed January 17, 2015].

Fangueiro, J.F. et al., 2014. Validation of a high performance liquid chromatography method for the stabilization of epigallocatechin gallate. *International Journal of Pharmaceutics*. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.08.053>.

Forester, S.C. & Lambert, J.D., 2014. *Cancer Preventive Effects of Green Tea Polyphenols*, Elsevier Inc. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123984562000980>.

Fritz, H. et al., 2012. Green Tea and Lung Cancer: A Systematic Review. *Integrative Cancer Therapies*.

Fu, T. et al., 2008. Simultaneous determination of the major active components of tea polyphenols in rat plasma by a simple and specific HPLC assay. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 875(2), pp.363–367.

Fukuda, I. et al., 2009. Suppression of cytochrome P450 1A1 expression induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in mouse hepatoma hepa-1c1c7 cells treated with serum of (-)-epigallocatechin-3-gallate- and green tea extract-administered rats. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 73(5), pp.1206–1208.

Ge, J. et al., 2012. In vitro study on the metabolism of epigallocatechin gallate (EGCG) in mouse's tissues. *Proceedings of 2012 International Symposium on Information Technologies in Medicine and Education, ITME 2012*, 2, pp.833–836.

Grant, P. & Dworakowska, D., 2013. *Tea and Diabetes: The Laboratory and the Real World*, Elsevier. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123849373000550> [Accessed February 4, 2015].

Hayat, K. et al., 2013. *Tea and Its Consumption: Benefits and Risks*, Available at: <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2012.678949>.

Higdon, J. V & Frei, B., 2003. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Critical reviews in food science and nutrition*, 43(January 2015), pp.89–143.

Hu, B. et al., 2013. Bioactive peptides/chitosan nanoparticles enhance cellular antioxidant activity of (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, pp.875–881.

Hu, M., 2007. Commentary: Bioavailability of flavonoids and polyphenols: Call to arms. *Molecular Pharmaceutics*, 4(6), pp.803–806.

Huang, J. et al., 2014. The anti-obesity effects of green tea in human intervention and basic

- molecular studies. *European Journal of Clinical Nutrition*, (May), pp.1–13. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ejcn.2014.143>.
- Hursel, R., Viechtbauer, W. & Westerterp-Plantenga, M.S., 2009. The effects of green tea on weight loss and weight maintenance: a meta-analysis. *International journal of obesity (2005)*, 33(9), pp.956–961. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2009.135>.
- Khurana, S. et al., 2013. Oxidative stress and cardiovascular health : therapeutic potential. , 212(March), pp.198–212.
- Kim, H.S., Quon, M.J. & Kim, J. a., 2014. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. *Redox Biology*, 2, pp.187–195. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.022>.
- Lambert, J.D. et al., 2003. Epigallocatechin-3-gallate is absorbed but extensively glucuronidated following oral administration to mice. *The Journal of nutrition*, 133(August), pp.4172–4177.
- Lambert, J.D. et al., 2004. Piperine enhances the bioavailability of the tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in mice. *The Journal of nutrition*, 134(April), pp.1948–1952.
- Lee, J., Chambers, D.H. & Chambers IV, E., 2014. A comparison of the flavor of green teas from around the world. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(August), pp.1315–1324.
- Lee, M.J. et al., 2000. An improved method for the determination of green and black tea polyphenols in biomatrices by high-performance liquid chromatography with coulometric array detection. *Analytical biochemistry*, 279, pp.164–169.
- Lee, M.J. et al., 1995. Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 4(4), pp.393–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7655336>.
- Lee, M.J. et al., 2002. Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: Formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 11(October), pp.1025–1032.
- Lenahan, C.E., 2013. *Encyclopedia of Forensic Sciences*, Elsevier. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123821652002440> [Accessed February 9, 2015].
- Lopez, S. et al., 2014. Membrane composition and dynamics: A target of bioactive virgin olive oil constituents. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1838(6),

- pp.1638–1656. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.01.007>.
- Meyer, V.R., 2013. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, Elsevier. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124095472000809> [Accessed February 9, 2015].
- Mukhtar, I.A.S. and H., 2012. Nanochemoprevention by Bioactive Food Components: A Perspective. *Changes*, 29(6), pp.997–1003.
- Pauli, E.D. et al., 2014. Mixture design analysis of solvent extractor effects on epicatechin, epigallocatechin gallate, epigallocatechin and antioxidant activities of the *Camellia sinensis* L. leaves. *Analytical Chemistry Research*, 2(September), pp.23–29. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214181214000196>.
- Paximada, P. et al., 2014. Food Hydrocolloids Bacterial cellulose as stabilizer of o / w emulsions. *Food hydrocolloids*, pp.1–8. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.12.003>.
- Persson, I.A.-L., 2013. *Tea Flavanols: An Overview*, Elsevier. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123849373000069> [Accessed January 19, 2015].
- Rossi, T. et al., Drink your prevention : beverages with cancer preventive phytochemicals. , pp.713–722.
- Schneider, K., Oltmanns, J. & Hassauer, M., 2004. Allometric principles for interspecies extrapolation in toxicological risk assessment - Empirical investigations. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 39, pp.334–347.
- Shrivastava, A. & Gupta, V., 2011. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists*, 2(1), p.21.
- Smith, T.J., 2012. Green Tea Polyphenols in drug discovery - a success or failure? , 6(6), pp.589–595.
- Tulipani, S. et al., 2012. Oil matrix effects on plasma exposure and urinary excretion of phenolic compounds from tomato sauces: Evidence from a human pilot study. *Food Chemistry*, 130(3), pp.581–590. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.078>.
- Wachira, F.N. et al., 2013. *The Tea Plants: Botanical Aspects*, Elsevier. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012384937300001X> [Accessed January 7, 2015].
- Wang, L. et al., 2014. Tea consumption and lung cancer risk: a meta-analysis of case-control and cohort studies. *Nutrition*, 30(10), pp.1122–1127. Available at:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0899900714001282>.

Wang, X. et al., 2013. Effects of green tea or green tea extract on insulin sensitivity and glycaemic control in populations at risk of type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Journal of human nutrition and dietetics : the official journal of the British Dietetic Association*, pp.1–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24206044>.

Wang, Z. et al., 2011. Black and green tea consumption and the risk of coronary artery. , 2004(5), pp.506–515.

Westerterp-Plantenga, M.S., 2010. Green tea catechins, caffeine and body-weight regulation. *Physiology and Behavior*, 100(1), pp.42–46. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.02.005>.

Yang, C.S., Chen, G. & Wu, Q., 2014. Recent Scientific Studies of a Traditional Chinese Medicine, Tea, on Prevention of Chronic Diseases. *Journal of traditional and complementary medicine*, 4(1), pp.17–23. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4032838&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Yang, J. et al., 2014. Tea consumption and risk of type 2 diabetes mellitus : a systematic review and meta-analysis update.

Yu, Y. et al., 2014. Green tea catechins: A fresh flavor to anticancer therapy. *Apoptosis*, 19, pp.1–18.

Zhang, S. et al., 2014. Systematic Analysis of the Multiple Bioactivities of Green Tea through a Network Pharmacology Approach. , 2014.

Zoppe, J.O., Venditti, R. a. & Rojas, O.J., 2012. Pickering emulsions stabilized by cellulose nanocrystals grafted with thermo-responsive polymer brushes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 369(1), pp.202–209. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2011.12.011>.