



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΜΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ- ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Εργαστήριο Χημείας- Βιοχημείας- Φυσικοχημείας Τροφίμων

Χαρίκλεια Κουνδουράκη

Μεταπτυχιακή Διατριβή

«Αντιοξειδωτικές ιδιότητες αφεψήματος Μελισσόχορτου

(*Melissa Officinalis* L.)»



Τριμελής Επιτροπή

Νικόλαος Καλογερόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής (Επιβλέπων),

Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Ισιδώρα Παπασιδέρη, Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Ανδριάννα Καλιώρα, Επίκουρη Καθηγήτρια, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Αθήνα 2015



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΜΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ- ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Εργαστήριο Χημείας- Βιοχημείας- Φυσικοχημείας Τροφίμων

Χαρίκλεια Κουνδουράκη

Μεταπτυχιακή Διατριβή

«Αντιοξειδωτικές ιδιότητες αφεψήματος Μελισσόχορτου

(*Melissa Officinalis* L.)»

Τριμελής Επιτροπή

Νικόλαος Καλογερόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής (Επιβλέπων),

Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Ισιδώρα Παπασιδέρη, Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Ανδριάννα Καλιώρα, Επίκουρη Καθηγήτρια, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Αθήνα, 2015

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Χημείας- Βιοχημείας- Φυσικοχημείας Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας και Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών της κατεύθυνσης της Κλινικής Διατροφής κατά το ακαδημαϊκό έτος 2014-2015 υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή καθηγητή κ. Νικόλαου Καλογερόπουλου.

Με την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου εργασίας, θα ήθελα, αρχικά να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Νίκο Καλογερόπουλο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάθεση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής καθώς και για τις γνώσεις που μου μετέδωσε σχετικά με τις χημικές αναλύσεις που απαιτούνταν για την εκπόνηση της. Η φιλική, πρόθυμη και με κατανόηση στάση του κάθε στιγμή με βοήθησαν να αισθάνομαι ευχάριστο το εργαστηριακό κομμάτι της εργασίας μου και να καταφέρω να την ολοκληρώσω με επιτυχία.

Θα ήθελα, ακόμη, να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Ανδριάννα Καλιώρα για τις γνώσεις και τη βοήθεια που μου παρείχε σχετικά με τις βιολογικές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας μελέτης καθώς και για τη φιλική της στάση.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κα. Ισιδώρα Παπασιδέρη για τη φιλική της στάση και για τις συμβουλές της σχετικά με τη διεύρυνση του αντικειμένου της έρευνας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να πω στην υποψήφια Διδάκτορα και φίλη μου Δήμητρα Κογιάννου, η οποία ήταν δίπλα μου καθόλη τη διάρκεια διεξαγωγής της μεταπτυχιακής μου διατριβής. Η πρόθυμη διάθεσή της να με βοηθήσει όποια στιγμή κι αν χρειαζόταν και η οικεία παρουσία της συνέβαλαν τα μέγιστα στο να ολοκληρωθεί με επιτυχία και μέσα σ'ένα ευχάριστο κλίμα η παρούσα διατριβή ενώ η κοινή μας αγωνία κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων αλλά και κατά τη συγγραφή της εργασίας μου με έκανε να νιώθω τη στήριξη και την αγάπη της.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Χάρη Πρατσίνη από το Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος». για την πρόθυμη στάση του, τη βοήθεια και τις γνώσεις που μας παρείχε καθώς και για τη χρήση του κυτταρομετρητή ροής.

Επίσης ευχαριστώ τον αείμνηστο Δρ Παναγιώτη Κεφάλα από το Μεσογειακό Αγρονομικό Ινστιτούτο Χανίων (ΜΑΙΧ) για την ανάλυση του αφεψήματος μελισσόχορτου με LC-MS, και τους Δρ Αικατερίνη Σακελλάρη και Δρ Σωτήρη Καραβόλτσο από το

Εργαστήριο Χημείας Περιβάλλοντος του ΕΚΠΑ για τον προσδιορισμό της συμπλεκτικής ικανότητας ιόντων Cu^{2+} με διαφορική Παλμική Ανοδική Αναδιαλυτική Βολταμμετρία.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω κάποια αγαπημένα μου πρόσωπα για την παρουσία τους δίπλα μου κάθε στιγμή, τη στήριξη και την αγάπη τους όλον αυτόν τον καιρό και, ειδικότερα, τους γονείς μου, την αδελφή μου και το Γιάννη.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	1
Abstract.....	3
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
1.1 Αρωματικά-Φαρμακευτικά Φυτά & Βότανα	7
1.2 Φυτοχημικά.....	8
1.2.1 Ορισμός	8
1.2.2 Ταξινόμηση Φυτοχημικών	9
1.2.2.1 Πολυφαινόλες	10
Φλαβονοειδή	11
Φαινολικά Οξέα.....	12
Ταννίνες.....	12
Στιλβένια & Λιγνάνες	13
Κουμαρίνες.....	14
1.2.2.2. Καροτενοειδή	14
1.2.2.3 Αλκαλοειδή- Τερπενοειδή.....	15
1.2.2.5 Θειούχες οργανικές ενώσεις	16
1.2.3 Βιολογικές Δράσεις.....	16
1.3 Καρκίνος	18
1.3.1 Γενικά Στοιχεία	18
1.3.2 Καρκίνος του προστάτη	20
1.3.3 Καρκίνος του παχέος εντέρου	23
1.4 Μηχανισμοί Δράσης Φυτοχημικών ενάντια στην εμφάνιση διαφόρων μορφών καρκίνου- Αντικαρκινική- Χημειοπροστατευτική Δράση	27
1.4.1 Εκδήλωση Αντιοξειδωτικής δράσης.....	29
1.4.2 Εκδήλωση Αντιφλεγμονώδους δράσης	39
1.4.2.1. Γενικά Στοιχεία	39
Προφλεγμονώδεις Κυτταροκίνες- Χημειοκίνες	42
Πυρηνικός παράγοντας NF-κΒ	45
Ενεργοποιούσα Πρωτεΐνη-1 (activator protein-1, AP-1)	47
Αναστολή Κυκλοξυγονασών (COX)	48
Αναστολή Λιποξυγονασών (LOX)	48

Επαγωγή Συνθάση του οξειδίου του αζώτου/ νιτρικού οξειδίου (inducible Nitric Oxide Synthase, iNOS)	49
Παράγοντες ανάπτυξης.....	49
Μεταγωγείς Σήματος και Ενεργοποιητές της Μεταγραφής (Signal Transducer and Activator of Transcription, STAT).....	50
1.4.3 Ρύθμιση των ενζύμων φάσης I και II.....	51
1.4.4 Αναστολή της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου (Cell cycle arrest).....	52
1.4.5 Επαγωγή των διαδικασιών Διαφοροποίησης και Απόπτωσης.....	54
1.4.6 Αναστολή της έκφρασης και της λειτουργικής ενεργοποίησης ογκογονιδίων	58
1.4.7 Επαγωγή της έκφρασης γονιδίων καταστολής όγκων.....	59
1.4.8 Αναστολή της αγγειογένεσης και της μετάστασης μέσω τροποποίησης των μονοπατιών μεταγωγής σήματος/κυτταρικής σηματοδότησης	60
1.5 Μελισσόχορτο (Melissa officinalis L., Lemon Balm)	61
Σκοπός.....	63
ΚΕΦΑΛΑΙΟ II: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ-ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	65
2.1 Προετοιμασία Εκχυλίσματος Βοτάνου και Διαδικασία παραλαβής αφυδατωμένου αφεψήματος	67
2.2 Ανάλυση Συστατικών του αφυδατωμένου αφεψήματος- Προσδιορισμός Πολυφαινολών	68
2.2.1 Προσδιορισμός συνολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin- Ciocalteu .	68
2.2.2 Προσδιορισμός ολικών φλαβονολών.....	70
2.2.3 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός απλών φαινολών και τερπενικών οξέων με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματοσκοπία/ φασματομετρία μάζας (Gas Chromatography- Mass Spectrometry, GC-MS)	71
2.2.4 Ποιοτικός προσδιορισμός φαινολικών συστατικών του αφυδατωμένου αφεψήματος με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας- φασματομετρίας μάζας (Liquid Chromatography- Mass Spectrometry, LC-DAD-MS)	75
2.2.5 Ποιοτικός προσδιορισμός πτητικών συστατικών με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας- φασματοσκοπίας/ φασματομετρίας μάζας (Gas Chromatography- Mass Spectrometry, GC-MS)	77
2.3 Αντιοξειδωτικές Δοκιμές.....	78
2.3.1 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιζόμενη στη δέσμευση της 1,1- διφαινυλο- 2- πικρυλο-υδραζύλο ελεύθερης ρίζας (DPPH•)	78

2.3.2 Προσδιορισμός αναγωγικής ικανότητας μέσω αναγωγής του Fe ³⁺ σε Fe ²⁺ (FRAP) ή Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιζόμενη στην αναγωγή του Fe ³⁺ σε Fe ²⁺ (FRAP)	79
2.3.3 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιζόμενη στη δημιουργία χηλικών συμπλόκων με κατιόντα μετάλλων	81
2.3.3.1 Ικανότητα δημιουργίας χηλικών συμπλόκων με κατιόντα σιδήρου (Fe ²⁺) με τη χρήση φεροζίνης	81
2.3.3.2 Ικανότητα δημιουργίας χηλικών συμπλόκων με κατιόντα χαλκού (Cu ²⁺) με τη μέθοδο της Διαφορικής Παλμικής Ανοδικής Αναδιαλυτικής Βολταμετρίας (Differential Pulse Anodic Stripping Voltametry, DPASV)	82
2.4 Κυτταρικές Σειρές	85
2.4.1 Κυτταρικές Σειρές HT29 και PC3	85
2.4.2 Καλλιέργεια κυττάρων	86
2.5 Μέθοδοι εκτίμησης της βιολογικής δράσης του αφεψήματος	89
2.5.1 Διαλυτοποίηση στερεού υπολείμματος αφεψήματος	89
2.5.2 Έλεγχος του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη μέθοδο MTT	90
2.5.3 Μέτρηση των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH)	92
2.5.4 Μέτρηση των επιπέδων της ιντερλευκίνης 8 (IL-8)	94
2.5.5 Μέτρηση του μεταγραφικού Πυρηνικού παράγοντα-κΒ p65 (NF-κΒ)	97
2.5.6 Μελέτη της επίδρασης του αφυδατωμένου αφεψήματος στον κυτταρικό θάνατο-απόπτωση με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής (Flow Cytometry, FACS)	99
2.6 Στατιστική επεξεργασία	104
ΚΕΦΑΛΑΙΟ III: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ	105
3.1 Παραλαβή αφυδατωμένου αφεψήματος	107
3.2 Χημικές Αναλύσεις	108
3.2.1 Ανάλυση των Συστατικών του αφυδατωμένου αφεψήματος	108
3.2.1.1 Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο (Total Phenolic Content, TPC)	108
3.2.1.2 Ολικές φλαβονόλες	110
3.2.1.3 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός απλών πολυφαινόλων και τερπενικών οξέων με τη μέθοδο GC-MS	110
3.2.1.4 Ποιοτικός προσδιορισμός φαινολικών συστατικών του αφυδατωμένου αφεψήματος με τη μέθοδο LC-DAD-MS	114

3.2.1.5 Ποιοτικός προσδιορισμός πτητικών συστατικών του αφυδατωμένου αφεψήματος με τη μέθοδο GC-MS	116
3.2.2 Αντιοξειδωτική Δράση.....	120
3.2.2.1 Ικανότητα Δέσμευσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH•	120
3.2.2.2 Αναγωγική Ισχύς του αφεψήματος.....	122
3.2.2.3 Ικανότητα Δημιουργίας Χηλικών Συμπλόκων με κατιόντα μετάλλων μετάβασης (Fe ²⁺ , Cu ²⁺)	122
3.3 Βιολογικές Δοκιμές	124
3.3.1 Μελέτη της επίδρασης του αφεψήματος στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυτταρικών σειρών HT-29 και PC-3	124
3.3.2 Μελέτη της επίδρασης του αφυδατωμένου αφεψήματος στον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση με τη μέθοδο FACS	129
3.3.3 Μελέτη της επίδρασης του αφεψήματος στα επίπεδα της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης (GSH).....	136
3.3.4 Μελέτη της επίδρασης του αφεψήματος στα επίπεδα της ιντερλευκίνης-8 (IL-8) στις κυτταρικές σειρές HT-29 και PC-3.....	140
3.3.5 Μελέτη της επίδρασης του αφεψήματος στα επίπεδα του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα-κΒ (NF-κΒ) p65 στις κυτταρικές σειρές HT-29 και PC-3.....	142
Επίλογος-Συμπεράσματα.....	146
ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	150
Βιβλιογραφία.....	152

Περίληψη

Το Μελισσόχορτο (*Melissa officinalis* L.) ανήκει στην οικογένεια *Lamiaceae* και αποτελεί ένα ευρέως διαδεδομένο αρωματικό-φαρμακευτικό φυτό που καταναλώνεται παραδοσιακά με τη μορφή αφεψήματος λόγω της καταπραϋντικής και σπασμολυτικής δράσης του. Οι ευεργετικές ιδιότητες που αφορούν στην υγεία αποδίδονται στο πλούσιο περιεχόμενό του σε βιοδραστικά συστατικά. Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν την προστατευτική δράση του Μελισσόχορτου και σε διάφορες μορφές καρκίνου.

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής ήταν ο προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών του αφεψήματος Μελισσόχορτου και η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης του. Εξετάσθηκε, επίσης, η πιθανή χημειοπροστατευτική δράση του αφεψήματος μέσω ελέγχου της ικανότητας του (α) να προκαλεί *in vitro* αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου (HT-29) και του προστάτη (PC3), (β) να επηρεάζει τα επίπεδα της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης (GSH) και (γ) να επιδρά στη συγκέντρωση σηματοδοτικών μορίων των κυττάρων, συγκεκριμένα, της ιντερλευκίνης-8 (IL-8) και του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB. Τέλος, μελετήθηκε κατά πόσον το αφέψημα προκαλεί απόπτωση των καρκινικών κυττάρων.

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων έδειξαν ότι το αφέψημα του Μελισσόχορτου είναι πλούσιο σε φαινολικά συστατικά, με συνολικό φαινολικό περιεχόμενο 759.8 ± 62.7 mg GAE/κούπα (200mL) και με κύριους εκπροσώπους το ροσμαρινικό οξύ και τις τερπενοειδείς φαινόλες θυμόλη και καρβακρόλη. Επιπλέον, παρουσίασε ισχυρή αντιοξειδωτική δράση καθώς βρέθηκε ότι (α) είναι σε θέση να δεσμεύει τη σταθερή ελεύθερη ρίζα DPPH•, (β) εμφανίζει αναγωγική δράση ανάγοντας τα ιόντα σιδήρου (Fe^{3+}) και (γ) σχηματίζει χηλικά σύμπλοκα με τα κατιόντα σιδήρου (Fe^{2+}) και χαλκού (Cu^{2+}). Το αφέψημα ανέστειλε αποτελεσματικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των HT-29 και PC3 κυττάρων με δοσο- και χρόνο-εξαρτώμενο τρόπο προκαλώντας αναστολή στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Τέλος, οι μετρήσεις με κυτταρομετρία ροής κατέδειξαν ότι το αφέψημα επάγει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο.

Η επιβεβαίωση των ευρημάτων αυτών με *in vivo* πειράματα μπορεί να αναδείξει το αφέψημα Μελισσόχορτου ως ένα λειτουργικό τρόφιμο της Μεσογειακής Διατροφής που μπορεί να συμβάλλει στην πρόληψη χρόνιων νοσημάτων, όπως ο καρκίνος.

Λέξεις-Κλειδιά: Μελισσόχορτο, χημειοπροστασία, αντιοξειδωτική δράση, φυτοχημικά, απόπτωση

Abstract

Lemon balm (*Melissa officinalis* L.) is an aromatic-medicinal plant, member of the *Lamiaceae* family. It is widely consumed in the form of infusion, due to the sedative and anticonvulsant properties it presents. The health promoting properties of lemon balm have been attributed mainly to the high content of bioactive compounds, known as phytochemicals. Recent data suggest lemon balm's protective effect also in various types of cancer.

The present thesis aimed to identify the phenolic substances of Lemon balm infusion that is consumed in Greece and to evaluate its antioxidant and chemopreventive activity/capacity. On this purpose, the infusion was examined for its potential to: (a) scavenge free radicals, (b) inhibit proliferation in human colon cancer (*HT-29*) and prostate cancer (*PC3*) cells, (c) regulate the levels of the intracellular antioxidant enzyme glutathione (*GSH*), (d) modify the concentrations of the cellular signaling molecule *IL-8* and the transcription factor- κ B (*NF- κ B*) and (e) induce apoptosis.

According to the obtained results Lemon balm infusion is rich in phenolic compounds, with total phenolic content equal to 759.8 ± 62.7 mg GAE/cup (200mL) and major phenolic species the hydroxycinnamic acid rosmarinic acid and the terpenoid phenols thymol and carvacrol. Moreover, the infusion exhibited potent antioxidant capacity through (a) scavenging the stable free radical DPPH $\cdot$, (b) reducing Fe $^{3+}$ ions and (c) chelating both iron (Fe $^{2+}$) and copper (Cu $^{2+}$) ions. The infusion was shown to effectively inhibit cell proliferation of both *HT-29* and *PC3* cells in a dose- and time-dependent manner while arresting cell growth in the S phase of the cell cycle. Finally, the results obtained by flow cytometry indicated that treatment of cancer cells with the infusion resulted in apoptosis in a dose-dependent manner.

The confirmation of these findings with *in vivo* experiments would highlight Lemon balm infusion as a functional food of the Mediterranean diet capable to contribute in the prevention of chronic diseases such as cancer.

Keywords: *Melissa officinalis* L., Lemon balm, chemoprevention, antioxidant activity, phytochemicals, apoptosis

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Αρωματικά-Φαρμακευτικά Φυτά & Βότανα

Η χρήση των αρωματικών-φαρμακευτικών φυτών και των βοτάνων παρατηρείται ήδη από τα πρώτα χρόνια της εμφάνισης του ανθρώπου στην προσπάθεια ανεύρεσης μέσων που θα ήταν ευεργετικά για την υγεία και θα ανακούφιζαν από διάφορες μορφές άλγους και τραυματισμών (*Kaliora et al., 2014; Farzaneh & Carvalho, 2015*).

Στις μέρες μας, η χρήση αυτών των προϊόντων εντάσσεται στα πλαίσια της παραδοσιακής και εναλλακτικής ιατρικής. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), η παραδοσιακή ιατρική ορίζεται ως ένας κλάδος ο οποίος συμπεριλαμβάνει πρακτικές υγείας, προσεγγίσεις, γνώσεις και πεποιθήσεις που ενσωματώνουν φάρμακα προερχόμενα από φυτικές, ζωικές και ορυκτές πηγές, πνευματικές θεραπείες και τεχνικές, οι οποίες εφαρμόζονται είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό με τις συμβατικές θεραπείες με σκοπό την πρόληψη ή τη θεραπεία παθήσεων αλλά και τη διατήρηση του ευ ζειν (*WHO Database, 2003*).

Ως φαρμακευτικά (*medicinal plants*) χαρακτηρίζονται τα φυτά εκείνα που χρησιμοποιούνται για την πρόληψη και την αντιμετώπιση διαφόρων νοσημάτων αλλά και την ενίσχυση του ανθρώπινου οργανισμού. Τα φυτά αυτά περιέχουν ένα ή περισσότερα βιοδραστικά συστατικά στα οποία και αποδίδονται οι ευεργετικές δράσεις που εκδηλώνουν στην υγεία του ανθρώπου (*Srivastava et al., 1996*). Όσον αφορά τα αρωματικά φυτά (*aromatic plants*), βασικό χαρακτηριστικό τους είναι η περιεκτικότητα αιθέριων ελαίων σε διάφορα μέρη του φυτού (*Adam et al., 1998*).

Ο όρος βότανο (*herb, botanical*) αναφέρεται σε ποώδη φυτά που παράγουν σπόρους, ενδέχεται να διαθέτουν ξυλώδη στελέχη και τα οποία παύουν να δίνουν καρπούς στο τέλος της καλλιεργητικής περιόδου. Σύμφωνα με τον ορισμό που δίνεται στο *Λεξικό της Οξφόρδης*, ο όρος αναφέρεται, επίσης, σε τμήματα φυτών όπως είναι ο φλοιός, οι ρίζες, τα φύλλα, οι μίσχοι, οι καρποί και τα άνθη, τα εκχυλίσματα των οποίων πιστεύεται ότι φέρουν αρωματικές και φαρμακευτικές ιδιότητες. Τα βότανα χρησιμοποιούνται, επίσης, συχνά στις μαγειρικές παρασκευές χάρη στα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά αλλά και στη συντήρηση και αποθήκευση των τροφίμων (*Dorman et al., 2004; Kogiannou et al., 2013*).

Στην περιοχή της Μεσογείου εντοπίζεται μεγάλος αριθμός και μεγάλη ποικιλία αρωματικών φυτών και βοτάνων, τα οποία εκδηλώνουν πληθώρα φαρμακευτικών δράσεων. Αρκετά από αυτά είναι ενδημικά της συγκεκριμένης περιοχής και καταναλώνονται στην καθημερινότητα, ως επί το πλείστον, με τη μορφή ροφημάτων που

παρασκευάζονται με τον παραδοσιακό τρόπο αλλά και ως μυρωδικά (*Kogiannou et al., 2013; Kaliora et al., 2014*). Ο παραδοσιακός αυτός τρόπος αντιμετώπισης διαφόρων παθολογικών καταστάσεων οδήγησε στην πραγματοποίηση μελετών προκειμένου να διερευνηθεί ποια συστατικά των φυτών είναι υπεύθυνα για τις βιολογικές δράσεις αλλά και ποιοι μηχανισμοί μεσολαβούν αυτές τις δράσεις. Πλέον είναι γνωστό ότι οι ευεργετικές δράσεις στην υγεία είναι αποτέλεσμα της παρουσίας συστατικών των φυτών που είναι γνωστά με τον όρο *φυτοχημικά* ενώ το πλήθος των δράσεων που εμφανίζουν συνεχώς διευρύνεται, με αποτέλεσμα πολλά από αυτά να καλλιεργούνται σήμερα συστηματικά σε όλον τον κόσμο.

1.2 Φυτοχημικά

1.2.1 Ορισμός

Τις τελευταίες δεκαετίες το ενδιαφέρον των επιστημόνων έχει στραφεί σε σημαντικό βαθμό στη μελέτη των φυσικών συστατικών/ φυσικών ενώσεων που ανευρίσκονται στα φυτά και στα φυτικά τρόφιμα λόγω των ευεργετικών ιδιοτήτων που διαθέτουν και αφορούν στην υγεία του ανθρώπου. Οι ενώσεις αυτές που είναι γνωστές με τον όρο *φυτοχημικά*, θεωρείται ότι μπορούν να συμβάλλουν στην πρόληψη διαφόρων νοσημάτων αλλά και στη βελτίωση της ποιότητας ζωής (*Blasa et al., 2010; Wootton- Beard & Ryan, 2010; Lee et al., 2013*).

Τα φυτοχημικά αποτελούν μια ομάδα βιοδραστικών χημικών συστατικών τα οποία ανευρίσκονται με φυσικό τρόπο στα φυτά, τα φυτικά τρόφιμα και κάποιους μικροοργανισμούς (*Alarcón et al., 2008; Aura, 2008; Aly et al., 2010*). Πρόκειται για δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται σε σχετικά μικρές ποσότητες και δε συγκαταλέγονται στις θρεπτικές ουσίες καθώς η μη πρόσληψη τους δε συσχετίζεται με την εκδήλωση κάποιας διατροφικής ανεπάρκειας και δεν κρίνονται απαραίτητα για τη διατήρηση της ζωής (*Tomas- Barberan et al., 2000; Lapornik et al., 2005*). Όσον αφορά στη σημασία τους για τους οργανισμούς που τα περιέχουν, είναι γνωστό ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό του χρώματος, της οσμής και της γεύσης (*Alasalvar et al., 2001; Ignat et al., 2011*). Συμμετέχουν στην προσέλκυση των επικονιαστών χάρη στο χρωματισμό που αποδίδουν στα φυτά και τα προστατεύουν από την ακτινοβολία UV και τις υψηλές θερμοκρασίες (*Naczki & Shahidi, 2006 & Barros et al., 2013*). Επιπλέον, λειτουργούν ως παράγοντες που εμποδίζουν την προσβολή των φυτών από διάφορα παθογόνα και την κατανάλωση τους από παράσιτα, έντομα και φυτοφάγα ζώα λόγω ισχυροποίησης του φυτικού σκελετού, της στυφής γεύσης που προσδίδουν αλλά και του

γεγονότος ότι είναι τοξικά συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην ανάπτυξη και την αναπαραγωγή τους (Pora et al., 2002 & Barros et al., 2013).

Το διατροφικό ενδιαφέρον για τα φυτοχημικά έγκειται στο γεγονός ότι η πρόσληψή τους εξασφαλίζει ειδικά οφέλη για την υγεία και τη διατήρηση της ευεξίας καθώς έχει συσχετισθεί με τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης χρόνιων νοσημάτων όπως είναι τα καρδιαγγειακά, η εγκεφαλική δυσλειτουργία, ο σακχαρώδης διαβήτης, διάφορες μορφές καρκίνου αλλά και η λειτουργική φθορά που επέρχεται λόγω ηλικίας (Gordon, 1996 & Pérez- Jiménez et al., 2010; Lee et al., 2011). Η θετική αυτή συσχέτιση επιβεβαιώνεται τόσο από μελέτες παρατήρησης όσο και από προ-κλινικές και κλινικές δοκιμές (Visioli et al., 2011).

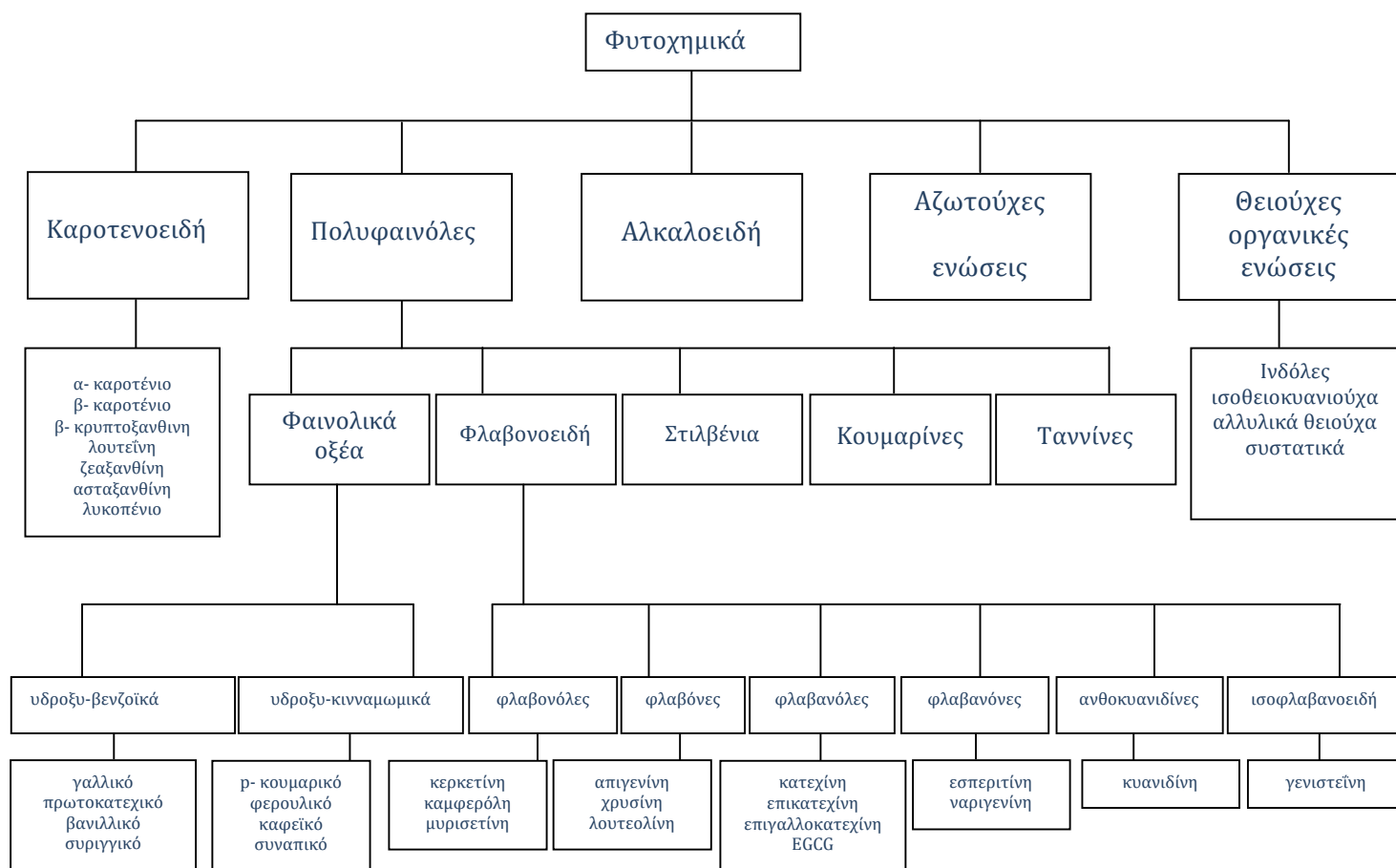
Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα των μελετών που έχουν διερευνήσει τις ιδιότητες και τις δράσεις των φυτοχημικών, υποδεικνύουν ότι εκδηλώνουν αντιβακτηριακή, αντιιική, αντιφλεγμονώδη και αντιεγκλωδωτική δράση (Goderska et al., 2008; de Pascual- Teresa et al., 2010; Hussain et al., 2007). Από τις σημαντικότερες δράσεις των φυτοχημικών, οι οποίες έχουν μελετηθεί εκτενώς, είναι η αντιοξειδωτική και η αντικαρκινική. Έχει τεκμηριωθεί πλέον ότι οι διάφορες κατηγορίες φυτοχημικών εμφανίζουν αντιοξειδωτικές και οξειδοαναγωγικές ιδιότητες (Proestos et al., 2005; Finley et al., 2011) προστατεύοντας με αυτόν τον τρόπο μόρια που είναι ευάλωτα στην οξείδωση όπως τα λιπίδια (Farzaneh & Carvalho, 2015). Επιπρόσθετα, μέσω αυτής της δράσης είναι σε θέση να αποτρέπουν βλάβες στο DNA ενισχύοντας την απόδοση του ανοσοποιητικού συστήματος και περιορίζοντας την παθογόνο μεταμόρφωση/ μετάλλαξη των κυττάρων συμβάλλοντας στην αντιμετώπιση του καρκίνου (Torbeyns, 2012-2013).

1.2.2 Ταξινόμηση Φυτοχημικών

Τα φυτοχημικά ταξινομούνται με βάση τις δομικές και λειτουργικές τους ομοιότητες στις ακόλουθες πέντε κατηγορίες (Pan et al., 2008):

1. Πολυφαινόλες
2. Καροτενοειδή
3. Αλκαλοειδή (αζωτούχες ενώσεις όπως τα τερπενοειδή, τα στεροειδή)
4. Θειούχες οργανικές ενώσεις
5. Άλλες αζωτούχες ενώσεις

Στο ακόλουθο διάγραμμα (Διάγραμμα 1.1) παρουσιάζεται η ταξινόμηση των φυτοχημικών στις βασικές τους κατηγορίες:



Διάγραμμα 1.1: Ταξινόμηση Φυτοχημικών (Liu, 2004).

1.2.2.1 Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες αποτελούν μια από τις πολυπληθέστερες κατηγορίες φυτοχημικών και είναι ευρέως διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο καθώς ανευρίσκονται στα φρούτα, τα λαχανικά, σε διάφορα αρωματικά- φαρμακευτικά φυτά, στον καφέ, το κρασί και το ελαιόλαδο (Ignat et al., 2011). Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί περισσότερες από 8000 φαινολικές δομές και από αυτές τουλάχιστον 4000 ανήκουν στην υποκατηγορία των φλαβονοειδών (Harborne & Williams, 2000; Cheynier, 2005; Ignat et al., 2011).

Τις τελευταίες δεκαετίες, οι διαιτητικές πολυφαινόλες έχουν προσελκύσει ιδιαίτερα το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας λόγω των ευεργετικών δράσεων που εκδηλώνουν στην υγεία του ανθρώπου (Tsao, 2010). Λόγω της ικανότητας τους να δεσμεύουν ελεύθερα ηλεκτρόνια, είναι σε θέση να σχηματίζουν σχετικά σταθερές φαινολικές ρίζες και κατ' επέκταση να σηματοδοτούν το τέλος αλυσιδωτών αντιδράσεων

οξειδωσης προστατεύοντας με αυτόν τον τρόπο τα κύτταρα από οξειδωτικές βλάβες (Chang et al., 2015). Συνεπώς, είναι δυνατόν να προλαμβάνουν και να μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης εκφυλιστικών ασθενειών που συσχετίζονται με το οξειδωτικό στρες όπως ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα και οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις (Duthie & Brown, 1994; Gordon, 1996; Chang et al., 2015). Έχει αναφερθεί ότι οι πολυφαινόλες μπορούν να τροποποιήσουν την έκφραση γονιδίων, να επάγουν την απόπτωση, να ρυθμίσουν τη δραστηριότητα ενζύμων που εμπλέκονται στη διαδικασία της καρκινογένεσης και της αποτοξίνωσης του οργανισμού (Duthie et al., 2000) ενώ υποστηρίζεται, ακόμη, ότι έχουν την ικανότητα να διακόπτουν τα διάφορα στάδια της καρκινογένεσης επιδεικνύοντας χημειοπροστατευτική δράση (Lambert et al., 2005).

Αυτή η κατηγορία φυτοχημικών ταξινομείται περαιτέρω σε ομάδες σύμφωνα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων που διαθέτουν, τα δομικά στοιχεία μέσω των οποίων ενώνονται οι δακτύλιοι μεταξύ τους, την πηγή προέλευσης τους και τη βιολογική τους λειτουργία (Bravo, 1998; Tsao, 2010; Ignat et al., 2011). Οι κυριότερες κατηγορίες των πολυφαινόλων είναι τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα, οι ταννίνες, τα στιλβένια, οι λιγνάνες και οι κουμαρίνες (D'Archivio et al., 2007).

Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή συνιστούν τη μεγαλύτερη υποομάδα πολυφαινολικών συστατικών (Balasundram et al., 2006). Πρόκειται για ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους που αποτελούνται από δεκαπέντε άτομα άνθρακα, διατεταγμένα σε διαμόρφωση C6-C3-C6. Ουσιαστικά, η δομή αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους (Α και Β) που ενώνονται μέσω μιας γέφυρας τριών ατόμων άνθρακα, συνήθως με τη μορφή ενός οξυγονωμένου ετεροκυκλικού δακτυλίου (C). Ο αρωματικός δακτύλιος Α προέρχεται από την οδό του οξικού/ μηλονικού ενώ ο δακτύλιος Β προέρχεται από φαινυλαλανίνη μέσω του μονοπατιού του σικιμικού οξέος (Merken & Beecher, 2000). Οι παραλλαγές στα σχήματα υποκατάστασης του δακτυλίου C έχει ως αποτέλεσμα την περαιτέρω κατηγοριοποίηση των φλαβονοειδών σε φλαβονόλες, φλαβανόλες ή κατεχίνες, φλαβονόνες, φλαβανόνες, ισοφλαβόνες και ανθοκυανίνες (Hollman & Katan, 1999). Διάφορες υποκαταστάσεις στους δακτυλίους Α και Β οδηγούν στη δημιουργία διαφορετικών ενώσεων μέσα σε κάθε υποκατηγορία φλαβονοειδών (Pietta, 2000). Αυτές οι υποκαταστάσεις μπορούν να περιλαμβάνουν οξυγόνωση, αλκυλίωση, γλυκοζυλίωση, ακυλίωση και σουλφονοποίησης (Balasundram et al., 2006).

Η συγκεκριμένη ομάδα πολυφαινολών αποτελείται από ιδιαίτερα σημαντικές αντιοξειδωτικές ενώσεις λόγω του υψηλού οξειδοαναγωγικού τους δυναμικού που τους επιτρέπει να δρουν ως αναγωγικοί παράγοντες, ως δότες ατόμων υδρογόνου, ως αποσβέστες του μονήρους οξυγόνου αλλά και ως ενώσεις που μπορούν να δημιουργούν χηλικά σύμπλοκα με κατιόντα μετάλλων (Tsao & Yang, 2003). Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι όταν τα φλαβονοειδή προσλαμβάνονται τακτικά και σε επαρκείς ποσότητες μέσω της διατροφής, εμφανίζουν θετική συσχέτιση με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης ασθενειών όπως ο καρκίνος και οι καρδιακές παθήσεις στον άνθρωπο (Beecher, 2003; Liu et al., 2008). Πλούσιες πηγές φλαβονοειδών αποτελούν τα φρούτα, τα λαχανικά και διάφορα αρωματικά φυτά. Έχει αναφερθεί ότι η περιεκτικότητά τους σε φλαβονοειδή μπορεί να επηρεαστεί από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως οι κλιματολογικές συνθήκες, οι συνθήκες ανάπτυξης και αποθήκευσης καθώς και ο τρόπος επεξεργασίας (Caridi et al., 2007).

Φαινολικά Οξέα

Τα φαινολικά οξέα είναι μη φλαβονοειδείς φαινολικές ενώσεις και εντοπίζονται στα φυτά είτε σε ελεύθερη είτε σε δεσμευμένη μορφή (Robbins, 2003; Kim et al., 2006). Στη δεσμευμένη τους μορφή, προσδένονται σε συστατικά των φυτών μέσω εστερικών, αιθερικών ή ακεταλικών δεσμών (Zadernowski et al., 2009) και μπορούν να απελευθερωθούν μόνο μέσω όξινης ή αλκαλικής υδρόλυσης ή μέσω ενζύμων (Tsao, 2010). Αποτελούνται από δυο υποκατηγορίες, τα υδροξυ-κινναμωμικά οξέα και τα υδροξυ-βενζοϊκά οξέα. Τα οξέα της πρώτης υποκατηγορίας προέρχονται από τη φαινυλαλανίνη και την τυροσίνη και μπορούν να βρίσκονται είτε ελεύθερα είτε δεσμευμένα ενώ κύριοι εκπρόσωποι της είναι το καφεϊκό οξύ, το φερουλικό οξύ, το σιναπικό οξύ και το p-κουμαρικό οξύ (Liu, 2004; Cheynier, 2005). Στη δεύτερη υποκατηγορία συμπεριλαμβάνονται το γαλλικό οξύ, το πρωτοκατεχικό, το βανιλικό και το συριγγικό οξύ (Bravo, 1998) και όταν αυτά σχηματίζουν εστέρες με το κινικό ή το τρυγικό οξύ ή με παράγωγα σακχάρων καλούνται χλωρογενικά οξέα (Liu, 2004; Cheynier, 2005).

Ταννίνες

Πρόκειται για υδατοδιαλυτές ενώσεις σχετικά μεγάλου μοριακού βάρους, οι οποίες αποτελούν την τρίτη μεγαλύτερη ομάδα πολυφαινολικών συστατικών και διακρίνονται στις υδρολυμένες και συμπυκνωμένες ταννίνες (Cai et al., 2004; Ignat et al., 2011). Οι υδρολυμένες ταννίνες αποτελούν εστέρες του γαλλικού οξέος ενώ οι συμπυκνωμένες

μορφές, οι οποίες είναι και περισσότερο διαδεδομένες στα διάφορα φυτά, αποτελούν πολυμερή των πολυ-υδροξυ-φλαβαν-3-ολών και είναι γνωστές και ως προανθοκυανιδίνες (Porter, 1989; Balasundram et al., 2006; Huang et al., 2009; Chang et al., 2015).

Οι ταννίνες εκδηλώνουν ποικίλες δράσεις στα βιολογικά συστήματα καθώς θεωρείται ότι διαθέτουν την ικανότητα δημιουργίας χηλικών συμπλόκων, συμμετέχουν στη διαδικασία καθίζησης πρωτεϊνών και, επιπλέον, αποτελούν σημαντικά αντιοξειδωτικά συστατικά (Hagerman, 2002; Ignat et al., 2011). Τα αποτελέσματα ερευνών που έχουν διεξαχθεί, υποστηρίζουν ότι προανθοκυανιδίνες είναι σε θέση να αποτρέπουν τη δημιουργία όγκων (Akhtar et al., 2009), να αναστέλουν την έκφραση κυκλινών (κυκλίνες D1 και D2) και κυκλινο- εξαρτώμενων κινασών (Cdks) (Prasad & Katiyar, 2012), να διακόπτουν/ αναστέλουν τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G1 (Grana & Reddy, 1995), να αναστέλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (King et al., 2007) και να επάγουν την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων μέσω της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια (Chang et al., 2013).

Στιλβένια & Λιγνάνες

Τα στιλβένια αποτελούν μη στεροειδή οιστρογόνα και συντίθενται από παράγωγα του κινναμωμικού οξέος. Αν και εντοπίζονται στο φυτικό βασίλειο, μόνο μια μικρή ποσότητα αυτών είναι παρούσα στην ανθρώπινη διατροφή (Ignat et al., 2011). Κύριος εκπρόσωπος αυτής της κατηγορίας είναι η ρεσβερατρόλη, η οποία εντοπίζεται σε σημαντικές ποσότητες στο κόκκινο κρασί αλλά και στο σταφύλι, τα μούρα και τα φυστίκια (Ignat et al., 2011; Grosso et al., 2013). Η ρεσβερατρόλη υπάρχει με τη μορφή cis- και trans-ισομερών κυρίως σε γλυκοζυλιωμένη μορφή (Delmas et al., 2006). Στα φυτά, η ρεσβερατρόλη παράγεται ως απόκριση στη μόλυνση από παθογόνους παράγοντες ή κάτω από συνθήκες στρες (Bavaresco, 2003).

Όσον αφορά τις δράσεις της στον ανθρώπινο οργανισμό, θεωρείται ότι μπορεί να ως αντιοξειδωτικός και χημειοπροστατευτικός παράγοντας λόγω της ικανότητας της να αναστέλλει τα διάφορα στάδια της καρκινογένεσης (έναρξη, προώθηση, εξέλιξη) (Bradamante et al., 2004). Υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι η ρεσβερατρόλη είναι σε θέση να παρεμβαίνει σε διάφορες οδούς μεταγωγής σήματος και να ρυθμίζει πρωτεΐνες που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο ενώ, παράλληλα, συνιστά έναν ισχυρό επαγωγέα μονοπατιών κυτταρικού θανάτου όπως είναι η απόπτωση, η αυτοφαγία και η μιτωτική καταστροφή σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές (Ulrich et al., 2005; Delmas et al., 2011). Πρόσφατα, η χημειοπροστατευτική δράση της συσχετίστηκε με την αναστολή της

δραστικότητας του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα NF-kB (Shankar et al., 2007). Επιπλέον, στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί ότι η ένωση αυτή διαθέτει αντιφλεγμονώδη δράση και ανοσορυθμιστικές ιδιότητες (de la Lastra & Villegas, 2007).

Οι λιγνάνες προκύπτουν έπειτα από οξειδωτικό διμερισμό δυο μονάδων φαινυλοπροπανίου και είναι, συνηθέστερα, παρούσες στην ελεύθερη τους μορφή. Το διατροφικό ενδιαφέρον γι αυτές έγκειται στο γεγονός ότι τόσο οι ίδιες οι λιγνάνες όσο και τα συνθετικά τους παράγωγα θεωρούνται παράγοντες με ποικίλες φαρμακολογικές δράσεις που μπορούν μεταξύ άλλων να έχουν εφαρμογή και στη διαδικασία της χημειοθεραπείας σε ασθενείς που πάσχουν από καρκίνο (Saleem et al., 2005; Ignat et al., 2011).

Κουμαρίνες

Οι κουμαρίνες είναι λακτόνες που λαμβάνονται με κυκλοποίηση του *cis-ορθο*-υδροξυκινναμωμικού οξέος και ανήκουν στα φαινολικά συστατικά που φέρουν το βασικό σκελετό C₆+C₃ (Huang et al., 2009). Το πρόδρομο μόριο τους σχηματίζεται μέσω ισομερισμού και υδροξυλίωσης του δομικού αναλόγου τους, δηλαδή του *trans*-υδροξυκινναμωμικού οξέος και των παραγώγων του. Ανευρίσκονται στα φυτά τόσο σε ελεύθερη μορφή όσο και με τη μορφή γλυκοζιτών (Fresco et al., 2006). Χαρακτηρίζονται από μεγάλη ποικιλία όσον αφορά στη χημική τους δομή, διαφέροντας κυρίως στο βαθμό οξυγόνωσης της ομάδας του βενζοπυρενίου, με τις C₇-υδροξυλιωμένες κουμαρίνες να αποτελούν τις πιο συχνά απαντώμενες (Cai et al., 2006).

Όσον αφορά στις δράσεις τους στην υγεία, υπάρχουν μελέτες που αναδεικνύουν τις κουμαρίνες ως παράγοντες που φέρουν αντιοξειδωτική, αντικαρκινική, αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακή και αντιπηκτική δράση ενώ μπορούν να δρουν, επίσης, ως παράγοντες κατά του ιού HIV (Lacy & O' Kennedy, 2004; Borges et al., 2005; Smyth et al., 2009).

1.2.2.2. Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή αποτελούν μια τάξη φυσικά απαντώμενων λιποδιαλυτών χρωστικών ουσιών που ανευρίσκονται κατά κύριο λόγο στα φυτά. Ωστόσο, τα καροτενοειδή απαντώνονται και σε ορισμένους μικροοργανισμούς και άλγη (Riccioni, 2009). Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί και αναγνωριστεί περισσότερα από 700 είδη καροτενοειδών, μόνο 24 από αυτά, όμως, έχουν ανιχνευθεί σε ανθρώπινο αίμα και ιστούς (Chang et al., 2015). Καθώς οι άνθρωποι και τα ζώα δεν είναι σε θέση να παράγουν καροτενοειδή, είναι απαραίτητο η πρόσληψή τους να γίνεται μέσω της διατροφής.

Υπάρχουν δυο διακριτές τάξεις καροτενοειδών, τα καροτένια και οι ξανθοφύλλες, διάκριση που γίνεται με βάση τη χημική σύσταση των ενώσεων που ανήκουν σε κάθε κατηγορία. Τα καροτένια συμπεριλαμβάνουν το α- και β- καροτένιο και το λυκοπένιο ενώ από τις ξανθοφύλλες οι κυριότεροι εκπρόσωποι είναι η λουτεΐνη, η ζεαξανθίνη, η β-κρυπτοξανθίνη και η ασταξανθίνη (*Jackson et al., 2008*). Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για υδρογονάνθρακες ή υδροξυλιωμένα παράγωγά τους που φέρουν, συνήθως, 8 ισοπρενοειδείς ομάδες και τα οποία μπορεί να είναι είτε κυκλοποιημένα (β- καροτένιο) είτε μη κυκλοποιημένα (λυκοπένιο) είτε και τα δυο. Λειτουργική μονάδα των καροτενοειδών αποτελούν οι συζυγιακοί διπλοί δεσμοί που εντοπίζονται στο δακτύλιο που φέρουν στα δυο άκρα της ακόρεστης υδρογονανθρακικής αλυσίδας (*Μπόσκου, 2004*).

Τα καροτενοειδή αποτελούν σημαντικές αντιοξειδωτικές ουσίες που έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν το μονήρες οξυγόνο συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην πρόληψη νοσημάτων όπως τα καρδιαγγειακά και ο καρκίνος και στη διατήρηση της καλής κατάστασης της υγείας (*Tapiero et al., 2004; Rao & Rao, 2007; Riccioni, 2009*). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι τα καροτενοειδή διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μείωση της συχνότητας ακτινοθεραπείας, τη μείωση της βαρύτητας των ανεπιθύμητων παρενεργειών από αυτήν αλλά και στην προστασία ιστών του σώματος από αυτήν σε ασθενείς ήδη πάσχοντες από καρκίνο (*Meyer et al., 2007*).

1.2.2.3 Αλκαλοειδή- Τερπενοειδή

Τα αλκαλοειδή αποτελούν μια ποικιλόμορφη δομικά ομάδα κυκλικών ενώσεων που περιέχουν άζωτο. Σήμερα έχουν αναγνωριστεί περισσότερα από 12000 αλκαλοειδή που περιέχονται στα φυτά (*Zulak et al., 2006*). Αν και δεν υπάρχει κάποια σαφής ταξινόμηση των αλκαλοειδών, αυτά, συνήθως, διακρίνονται με βάση τις δομικές τους ομοιότητες ή με βάση το κοινό πρόδρομο μόριο από το οποίο έχουν προέλθει (*Kennedy & Wightman, 2011*). Από αυτήν την ομάδα προέρχονται πολλά δηλητήρια, νευροτοξίνες καθώς και ψυχεδελικά φάρμακα και ναρκωτικά, όπως η ατροπίνη, η νικοτίνη, η καφεΐνη, η εφεδρίνη και η κοκαΐνη (*Zenk & Juenger, 2007*). Ωστόσο, αυτή η ομάδα ενώσεων συμμετέχει σημαντικά στη θεραπεία ρουτίνας που συνταγογραφείται για ασθενείς με τη νόσο Alzheimer μέσω αναστολής της χολινεστεράσης (*Mukherjee et al., 2007*).

Τα τερπενοειδή συνιστούν, επίσης, μια μεγάλη και ποικιλόμορφη ομάδα λιποδιαλυτών ενώσεων (*Pan et al., 2008*). Δομικά περιλαμβάνουν μια ή περισσότερες ομάδες ισοπρενίου, οι οποίες βιοσυντίθενται σε όλους τους οργανισμούς μέσω δυο πιθανών οδών, είτε αυτήν του μεβαλονικού οξέος είτε αυτήν της δεοξυ-d-ξυλουλόξης (*Rohmer, 1999*). Ανάλογα με τον

αριθμό των ισοπρενοειδών ομάδων που φέρουν στο μόριο τους, τα τερπενοειδή διακρίνονται σε ημιτερπένια (ισοπρένιο- 1 ισοπρενική ομάδα), μονοτερπένια (2 ισοπρενικές ομάδες), σεσκιτερπένια (3 ισοπρενικές ομάδες), διτερπένια (4 ισοπρενικές ομάδες), τριτερπένια (6 ισοπρενικές ομάδες) και τετρατερπένια (8 ισοπρενικές ομάδες) (Kennedy & Wightman, 2011). Οι ρητίνες και τα αιθέρια έλαια από διάφορα φυτά περιέχουν μεγάλη ποικιλία τερπενοειδών, είτε μόνο πτητικά (αιθέρια έλαια) είτε μίγμα πτητικών και μη πτητικών τερπενοειδών (ρητίνες). Χαρακτηριστικές ενώσεις της κατηγορίας αυτής είναι το λιμονένιο από το κίτρο καθώς και η μενθόλη από το δυόσμο (Shahidi & Ho, 2003).

Αξίζει να αναφερθεί ότι πολλά τερπενοειδή μπορεί να επιδεικνύουν σημαντική τοξική δράση για κάποια έντομα και πολύ χαμηλή τοξικότητα στα θηλαστικά συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Οι δράσεις που τους έχουν αποδοθεί συμπεριλαμβάνουν την αντιμικροβιακή, την ανασταλτική όσον αφορά τους υποδοχείς χολινεστεράσης και τις άμεσες αλληλεπιδράσεις με το σύστημα του γ- αμινο-βουτυρικού οξέος (GABA) (Rattan, 2010). Μέσω αυτόν των δράσεων μπορούν αν συμβάλλουν θετικά στην αντιμετώπιση της άνοιας και στη βελτίωση των γνωστικών και συμπεριφορικών λειτουργιών σε άτομα που πάσχουν από άνοια/ νόσο Alzheimer (Akhondzadeh et al, 2003).

1.2.2.5 Θειούχες οργανικές ενώσεις

Σε αυτήν την ομάδα φυτοχημικών ανήκουν οι ινδόλες, οι ισοθειοκυανικές ενώσεις και άλλες αλλυλικές θειούχες ενώσεις. Οι ενώσεις αυτές, σε αντίθεση με τις πολυφαινόλες και τα καροτενοειδή, δεν επιδεικνύουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, μπορούν να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων με έμμεσο τρόπο (Loo, 2003), ενεργοποιώντας αντιοξειδωτικά ένζυμα φάσης II (Ye & Zhang, 2001), αυξάνοντας τα επίπεδα της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης (μέσω της ικανότητας τους να δρουν ως υπόστρωμα για τις τρανσφεράσες της γλουταθειόνης) (Kolm et al., 1995; Ye & Zhang, 2001), επάγοντας διακοπή του κυτταρικού κύκλου (Gamet-Payrastre et al., 2000) και απόπτωση σε κύτταρα καρκινικών σειρών (Fimognari et al., 2002).

1.2.3 Βιολογικές Δράσεις

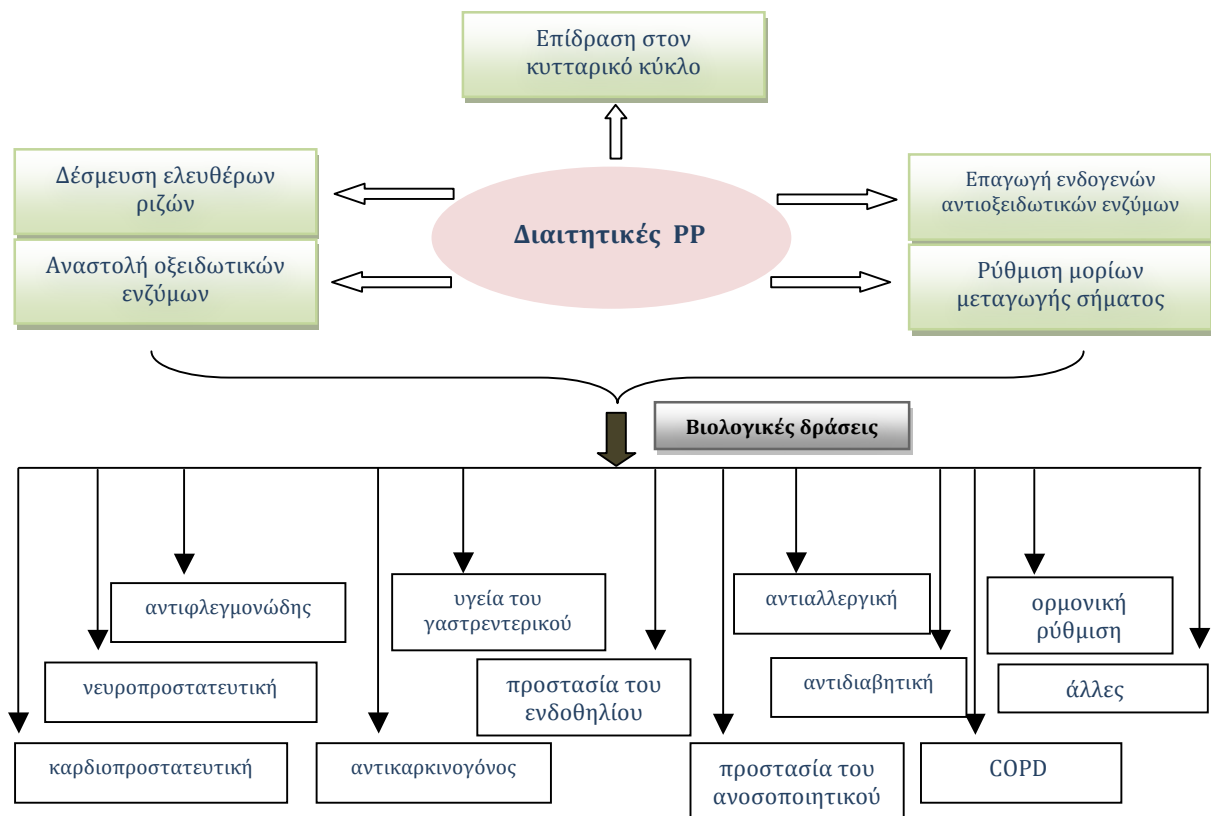
Όπως γίνεται φανερό από τα παραπάνω, τα φυτοχημικά αποτελούν συστατικά που διαθέτουν ένα μεγάλο εύρος δράσεων. Μια διατροφή που συμπεριλαμβάνει τρόφιμα όπως τα φρούτα, τα λαχανικά, προϊόντα ολικής άλεσης, ροφήματα όπως ο καφές, το κρασί, το τσάι, η μπύρα, διάφορα αρωματικά φυτά και βότανα καθώς και μπαχαρικά είναι σε θέση

να εξασφαλίσει επαρκείς ποσότητες προσλαμβανόμενων φυτοχημικών συνεισφέροντας στη διατήρηση της καλής υγείας και την πρόληψη νοσημάτων (*de Kok et al., 2008*). Οι τεκμηριωμένες επιδράσεις των φυτοχημικών, και ιδιαίτερα των πολυφαινόλων, στην ανθρώπινη υγεία συμπεριλαμβάνουν τις ακόλουθες (*Kanadaswami et al., 2005; Soobrattee et al., 2005; Han et al., 2007*):

- ✓ Αντιοξειδωτική
- ✓ Αντιφλεγμονώδης
- ✓ Αντιμικροβιακή
- ✓ Αντιική
- ✓ Αντιαλλεργική
- ✓ Αντιγηραντική
- ✓ Καρδιοπροστατευτική
- ✓ Αντιαθηρογόνος
- ✓ Αντιθρομβωτική
- ✓ Αγγειοδιασταλτική
- ✓ Ηπατοπροστατευτική
- ✓ Αντικαρκινογόνος
- ✓ Αντιαποπρωτική
- ✓ Ανασταλτική (στις διαδικασίες του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της αγγειογένεσης)
- ✓ Αντιδιαβητική

Όσον αφορά τις πολυφαινόλες, στη δράση των οποίων εστιάζει κυρίως και η παρούσα εργασία, τα δεδομένα υποστηρίζουν ότι μπορούν να εκδηλώνουν έμμεσα τις προαναφερθείσες δράσεις μέσω ενεργοποίησης ενδογενών αντιοξειδωτικών ενζύμων, τροποποίησης κυτταρικών μονοπατιών μεταγωγής σήματος και φλεγμονής αλλά και επίδρασης στις διαδικασίες κυτταρικού πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης και απόπτωσης (*Loo, 2003; Issa et al., 2006; Han et al., 2007*), μηχανισμοί που αναλύονται στην ενότητα 1.4.

Στην Εικόνα 1.1 παρουσιάζονται οι δράσεις των φυτοχημικών στην υγεία καθώς και οι μηχανισμοί με τους οποίους αυτές εκδηλώνονται.



Εικόνα 1.1: Βιολογικές Δράσεις Φυτοχημικών (*Han et al., 2007*)

Στη συνέχεια θα περιγραφούν αναλυτικά μόνο οι βιολογικές δράσεις που συσχετίζονται με την πρόληψη και την αντιμετώπιση του καρκίνου.

1.3 Καρκίνος

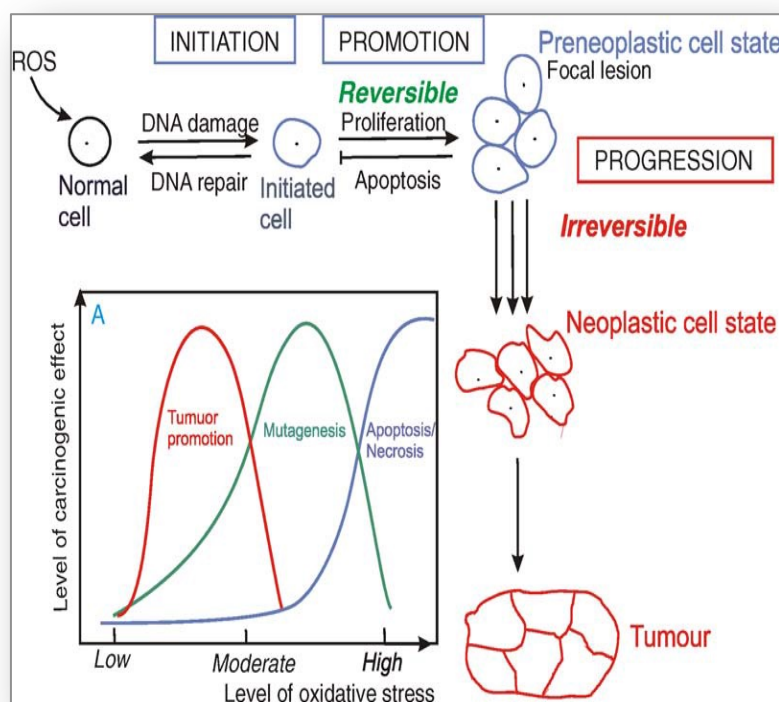
1.3.1 Γενικά Στοιχεία

Τα τελευταία χρόνια, ο καρκίνος συνιστά ένα ολοένα και μεγαλύτερο πρόβλημα υγείας λόγω της αυξανόμενης συχνότητας εμφάνισης του και αποτελεί τη δεύτερη κύρια αιτία θανάτου παγκοσμίως ακολουθώντας τα καρδιαγγειακά νοσήματα (*Huang et al, 2009*). Πρόκειται για μια πολυπαραγοντική νόσο, στην εμφάνιση της οποία εμπλέκονται περιβαλλοντικοί, χημικοί, φυσικοί, μεταβολικοί και γενετικοί παράγοντες οι οποίοι επιδρούν με άμεσο ή έμμεσο τρόπο (*Dai & Mumper, 2010*).

Στους καρκινογόνους παράγοντες συγκαταλέγονται η υπερϊώδης και η ιονίζουσα ακτινοβολία, ο καπνός (*Raposo et al., 2007*), η μόλυνση από ιούς (*Lee et al., 2007; Tabor, 2007*), βακτήρια (*Shiotani et al., 2005*) και παράσιτα (*Vauhkonen et al., 2007*) και η μόλυνση των τροφίμων από μυκοτοξίνες. Κάποιες μορφές καρκίνου οφείλονται στην παρουσία δραστικών μορφών οξυγόνου και ελευθέρων ριζών καθώς η αυξημένη παραγωγή τους

είναι πιθανό να προκαλέσει οξειδωτική βλάβη σε βιομόρια όπως οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και φυσικά το DNA (Poulsen et al., 1998; Valko et al., 2007).

Η εμφάνιση/ ανάπτυξη του καρκίνου είναι μια διαδικασία που χαρακτηρίζεται από πολλαπλά στάδια, με τις ελεύθερες ρίζες να εμπλέκονται σε καθένα από αυτά (Klaunig & Kamendulis, 2004). Πιο συγκεκριμένα, περιλαμβάνει μια σειρά από επιμέρους βήματα, τα οποία είναι τα ακόλουθα: έναρξη, προαγωγή/προώθηση, εξέλιξη, εισβολή και μετάσταση (Neergheen et al., 2010), τα οποία παρουσιάζονται σχηματικά



Εικόνα 1.2: Τα 3 βασικά στάδια της καρκινογένεσης (Έναρξη-Προαγωγή-Εξέλιξη).

στην Εικόνα 1.2. Η έναρξη- δημιουργία του όγκου, τοποθετείται χρονικά τη στιγμή που προκαλείται μια μη θανάσιμη μετάλλαξη-βλάβη στο DNA ενός κυττάρου ή ενός πληθυσμού κυττάρων λόγω έκθεσης σε καρκινογόνους παράγοντες (Valko et al., 2004; Dai & Mumper, 2010) και πρόκειται για μια μη αντιστρεπτή διαδικασία. Οι καρκινογόνοι παράγοντες μπορούν να προέρχονται από τις ακόλουθες τρεις κύριες πηγές: (α) κάπνισμα, (β) μόλυνση/φλεγμονή και (γ) διατροφή (Doll & Peto, 1981).

Στην περίπτωση που η βλάβη στο DNA διαφύγει των επιδιορθωτικών μηχανισμών που διαθέτει το κύτταρο, είναι πιθανό να οδηγήσει σε μετάλλαξη. Η βλάβη που προκύπτει σε κάποιο σωματικό κύτταρο, μπορεί να αναπαραχθεί κατά τη διαδικασία της μίτωσης και να οδηγήσει στη δημιουργία κλώνου μεταλλαγμένων κυττάρων. Το στάδιο της προαγωγής του όγκου χαρακτηρίζεται από εκλεκτική κλωνική επέκταση των αρχικών κυττάρων που φέρουν τη μετάλλαξη, η οποία έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό πολυκύτταρων προκαρκινικών πληθυσμών, τα οποία ονομάζονται νεοπλασματικά κύτταρα, που μπορούν να πολλαπλασιάζονται ενεργά και να διαφεύγουν της αποπτωτικής διαδικασίας (Su et al., 2013). Το στάδιο αυτό της διαδικασίας της καρκινογένεσης είναι αντιστρεπτό. Κατά το στάδιο της εξέλιξης, το οποίο χαρακτηρίζεται μη αντιστρέψιμο, οι προκαρκινικοί

κυτταρικοί πληθυσμοί μετατρέπονται σε όγκους ενώ στα τελευταία στάδια, της εισβολής και της μετάστασης, τα καρκινικά κύτταρα αποσπώνται από την πρωτογενή μάζα του όγκου και μεταναστεύουν μέσω των περιβάλλοντων ιστών προς τα αιμοφόρα και τα λεμφικά αγγεία δημιουργώντας ένα δεύτερο σημείο βλάβης-δημιουργία δευτερογενών όγκων (Weng & Yen, 2012). Είναι πλέον γνωστό ότι η μετάσταση αποτελεί την κυριότερη αιτία θνησιμότητας από καρκίνο.

Στον ανθρώπινο οργανισμό, η διαδικασία της καρκινογένεσης δε συμβαίνει πάντα μέσω των διακριτών σταδίων που περιγράφηκαν. Χαρακτηρίζεται κυρίως από τη συσσώρευση μεταβολών σε γονίδια που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της καρκινογένεσης, όπως είναι τα ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την αλλαγή κυτταρικών διεργασιών όπως η απόπτωση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική ωρίμανση και η διαφοροποίηση (Stanley, 1995; Ramos, 2007; Su et al., 2013). Η ανασταλτική δράση που ασκούν τα φυτοχημικά στη διαδικασία της καρκινογένεσης και την ανάπτυξη των όγκων μπορεί να συμβεί είτε μέσω τροποποίησης της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου είτε μέσω παρέμβασης στις βασικές κυτταρικές λειτουργίες (κυτταρικός κύκλος, απόπτωση, φλεγμονή, εισβολή και μετάσταση) (Kampa et al., 2007).

Ακολούθως, περιγράφονται οι δυο μορφές καρκίνου που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, του προστάτη και του παχέος εντέρου. Η επιλογή στηρίχθηκε στο γεγονός ότι πρόκειται για δυο τύπους καρκίνου που επηρεάζονται σημαντικά από τη διατροφή και, πλέον, είναι ευρέως αποδεκτό ότι η βέλτιστη διατροφή μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο εμφάνισης και ανάπτυξης διάφορων χρόνιων νοσημάτων συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου. Αξίζει να σημειωθεί ότι ήδη από παλαιότερα δεδομένα υποστηρίζεται ότι 35% της θνησιμότητας από όλες τις μορφές καρκίνου στον άνθρωπο έχει αποδοθεί στη διατροφή (Doll & Peto, 1981).

1.3.2 Καρκίνος του προστάτη

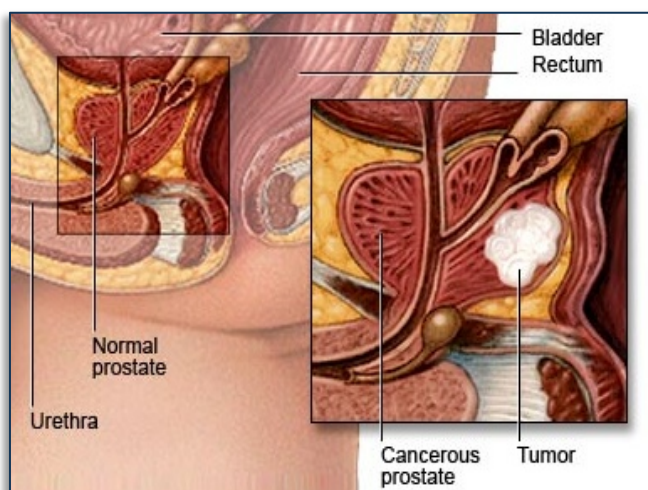
Σύμφωνα με πρόσφατα επιδημιολογικά δεδομένα, ο καρκίνος του προστάτη (Pca) αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνά εμφανιζόμενη μορφή καρκίνου και την έκτη κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο σε άτομα ανδρικού φύλου (Jemal et al., 2011). Η συχνότητα εμφάνισης νέων περιστατικών με καρκίνο του προστάτη έχει σημειώσει σημαντική αύξηση τις τελευταίες δεκαετίες, γεγονός που οφείλεται τόσο στην κινητοποίηση για πραγματοποίηση διαγνωστικών εξετάσεων όσο και στις σύγχρονες διαδικασίες έγκαιρης ανίχνευσης της νόσου (Vance et al., 2013).

Η διαδικασία ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη περιλαμβάνει τη μετατροπή του φυσιολογικού αδενικού επιθηλίου σε προνεοπλασματικό επιθήλιο με χαρακτηριστικές αλλοιώσεις και τελικά σε διηθητικό αδenoκαρκίνωμα. Προηγείται, επομένως, μια προ-καρκινωματώδης κατάσταση η οποία καλείται προστατική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (PIN) και η οποία χαρακτηρίζεται από όλες τις

φαινοτυπικές, γενετικές και βιοχημικές αλλοιώσεις πλην της προσβολής της βασικής μεμβράνης (Bostwick et al., 2004). Η προαναφερθείσα διαδικασία είναι αποτέλεσμα τόσο γενετικών όσο και επιγενετικών αλλαγών (Nambiar & Singh, 2013).

Η ακριβής αιτία για τον κακοήγη μετασχηματισμό του προστάτη δεν έχει ακόμη εξακριβωθεί. Ωστόσο, μέχρι και σήμερα, κυριότερες αιτίες στις οποίες αποδίδεται η εμφάνιση της νόσου παραμένουν η παρουσία χρόνιας φλεγμονής και το οξειδωτικό στρες, καταστάσεις που οδηγούν στην αύξηση του ρυθμού μεταλλάξεων και την επακόλουθη ανάπτυξη και εξέλιξη καρκίνου (Nambiar & Singh, 2013). Η ηλικία, το οικογενειακό ιστορικό, περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η έκθεση σε διάφορες καρκινογόνες ουσίες (Schmid et al., 2007), ο τρόπος ζωής και οι διατροφικές συνήθειες (Dagnelie et al., 2004) είναι μερικοί από τους πιο σημαντικούς παράγοντες κινδύνου που συσχετίζονται με την εμφάνιση της νόσου (Nambiar & Singh, 2013; Lall et al., 2015).

Όσον αφορά τη διατροφή, υπάρχουν μελέτες που συσχετίζουν θετικά την πρόσληψη λίπους, κυρίως του συνολικού ζωικού λίπους (Colli & Colli, 2006), των κορεσμένων και trans-λιπαρών οξέων (Rohan et al., 1995; Lee et al., 1998) αλλά και των μονοακόρεστων (Kristal et al., 2002; Bidoli et al., 2005), με την εμφάνιση καρκίνου του προστάτη. Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών, ωστόσο, δεν επιβεβαιώνονται από άλλους ερευνητές και δεν λαμβάνουν καθολική αποδοχή (Park et al., 2007; Crowe et al., 2008). Τέλος, σχετικά με τον τρόπο ζωής, μελέτες υποστηρίζουν ότι η υιοθέτηση προτύπων διατροφής που ακολουθούνται κυρίως στις Δυτικές κοινωνίες εμφανίζει θετική συσχέτιση με την εμφάνιση της νόσου (Moyad & Carroll, 2004; Nambiar & Singh, 2013).



Εικόνα 1.3: Καρκίνος του προστάτη

Εκτός από τους παράγοντες που αναφέρθηκαν παραπάνω, οι διάφορες γενετικές αλλοιώσεις που μπορούν να συμβούν, συνεισφέρουν, επίσης, στην εμφάνιση κακοήθους όγκου στον αδένα του προστάτη. Μερικά από τα γονίδια που πιστεύεται ότι εμπλέκονται στη διαδικασία αυτή και προάγουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων είναι τα HPC1 (Hereditary Prostate Cancer gene 1), το γονίδιο για τον υποδοχέα των ανδρογόνων (AR), το γονίδιο του υποδοχέα της βιταμίνης D κι ένα ακόμη γονίδιο σύντηξης (TMPRSS2-ETS) (Schaid, 2004; Tomlins et al., 2005). Καθώς οι μη τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου, όπως η φυλή, η εθνικότητα, η ηλικία, το οικογενειακό ιστορικό και η γενετική προδιάθεση, σπάνια μπορούν να αποτελέσουν αντικείμενο διαχείρισης, στόχος των παρεμβάσεων που αφορούν στην πρόληψη της εμφάνισης του καρκίνου του προστάτη παραμένουν οι τροποποιήσιμοι παράγοντες που περιλαμβάνουν τις διατροφικές συνήθειες και τον τρόπο ζωής (Nambiar & Singh, 2013).

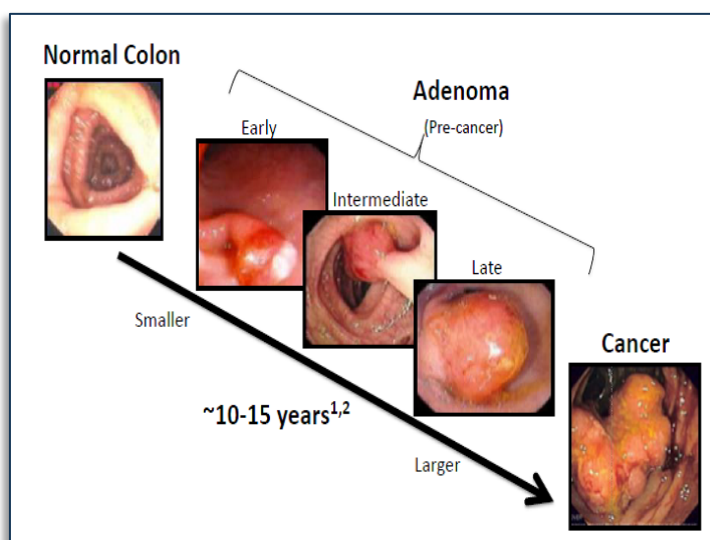
Ο καρκίνος του προστάτη θεωρείται ως μια από τις πιο κατάλληλες παθήσεις για την εφαρμογή χημειοπροστατευτικής παρέμβασης εξαιτίας του γεγονότος ότι χαρακτηρίζεται από μια παρατεταμένη λανθάνουσα περίοδο, δηλαδή απαιτείται μεγάλο χρονικό διάστημα για την εξέλιξη του, συνήθως 2-3 δεκαετίες (Nambiar & Singh, 2013). Οι παράγοντες που χρησιμοποιούνται ως χημειοπροστατευτικοί έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν ή να επιβραδύνουν ένα ή περισσότερα στάδια της διαδικασίας της καρκινογένεσης συμβάλλοντας αποτελεσματικά στη μείωση τόσο της επαγωγής όσο και της εξέλιξης του καρκίνου (Sporn & Suh, 2002). Γι αυτό το λόγο, παρεμβάσεις που συμπεριλαμβάνουν και χημειοπροστατευτική προσέγγιση και που λαμβάνουν χώρα κατά το στάδιο των προνεοπλασματικών αλλοιώσεων ή που συμβάλλουν στην καταστολή της ανάπτυξης των κακοήθων όγκων, θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια εναλλακτική στρατηγική προκειμένου να περιοριστεί και να ελεγχθεί η επίπτωση της νόσου.

Ανάμεσα στους παράγοντες που χρησιμοποιούνται για χημειοπροστασία στον καρκίνο του προστάτη συγκαταλέγονται ενώσεις που ανήκουν στα φυτοχημικά, όπως οι τα καροτενοειδή και οι διαιτητικές πολυφαινόλες, οι οποίες προέρχονται είτε από τα φρούτα και τα λαχανικά είτε από διάφορα βότανα που καταναλώνονται ως αφεψήματα (Khan et al., 2013; Lall et al., 2015). Οι θετικές επιδράσεις των φαινολικών συστατικών στην υγεία εξαρτώνται τόσο από την ποσότητα που προσλαμβάνεται όσο και από τη βιοδιαθεσιμότητά τους (Manach et al., 2004; D'Archivio et al., 2007). Έχει αναφερθεί ότι αυτά τα συστατικά είναι σε θέση να ρυθμίζουν σημαντικές πρωτεΐνες στα πολύπλοκα μονοπάτια μεταγωγής σήματος που σχετίζονται με τη κυτταρική διαφοροποίηση, τον

κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετάσταση και την απόπτωση (Syed et al., 2007; Ramos, 2008). Οι τρόποι με τους οποίους αυτά τα συστατικά εκδηλώνουν τη χημειοπροστατευτική τους δράση θα περιγραφεί αναλυτικότερα σε επόμενη παράγραφο.

1.3.3 Καρκίνος του παχέος εντέρου

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί την τρίτη πιο συχνά εμφανιζόμενη μορφή καρκίνου για τους άνδρες (746.000 νέα περιστατικά/ έτος) και τη δεύτερη μορφή για τις γυναίκες (614.000 νέα περιστατικά/ έτος) (GLOBOCAN 2012). Συνιστά την τέταρτη κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως και για τα δυο φύλα και αναφέρεται ότι κάθε χρόνο σημειώνονται 600.000 θάνατοι από



Εικόνα 1.4: Καρκίνος του παχέος εντέρου

τη νόσο αυτή (Ferlay et al., 2008). Η ιδιαίτερα ανησυχητική αύξηση των καταγεγραμμένων περιστατικών καρκίνου του παχέος εντέρου κατά τα τελευταία έτη καθιστά αυτή τη μορφή καρκίνου ένα μείζον πρόβλημα για την υγεία (Levin et al., 2008).

Ο συγκεκριμένος τύπος καρκίνου είναι το αποτέλεσμα μιας σειράς αλλαγών στο γονιδίωμα που οδηγούν στη μετατροπή των φυσιολογικών κυττάρων του επιθηλίου του παχέος εντέρου σε αδenoκαρκίνωμα (Grady, 2004). Αιτιολογικά, η εμφάνιση της νόσου μπορεί είτε να οφείλεται στο γενετικό υπόβαθρο του ατόμου είτε να είναι επίκτητη. Στην περίπτωση που η νόσος είναι κληρονομική, ενδέχεται είτε να έχει μεταβιβαστεί κάποια μετάλλαξη σε γονίδια επιδιόρθωσης αναντίστοιχων βάσεων είτε να έχει μεταβιβαστεί μια μετάλλαξη στο γονίδιο APC. Εάν η νόσος είναι επίκτητη μπορεί να είναι αποτέλεσμα μετάλλαξης κατά της διάρκειας της φυσιολογικής ζωής του κυττάρου ή έκθεσης σε καρκινογόνες ουσίες (από συστατικά της διατροφής, που έρχονται σε άμεση επαφή με το έντερο, ή το περιβάλλον- ακτίνες X, ακτίνες γ-) ή επακόλουθο του τρόπου ζωής του ατόμου (Grady, 2004; Young et al., 2005).

Η διαδικασία της εξέλιξης της νόσου χαρακτηρίζεται από προοδευτικές διαταραχές τόσο του γονιδιώματος (ασταθές γονιδίωμα) όσο και της βιολογίας της περιοχής που εντοπίζεται ο όγκος (Young et al., 2005). Κατά το στάδιο πριν την ολοκλήρωση της

ογκογένεσης, ο φαινότυπος των κυττάρων αλλάζει σταδιακά. Όπως και στις υπόλοιπες μορφές καρκίνου, οι διαδικασίες του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της κυτταρικής διαφοροποίησης και της απόπτωσης, οι οποίες υπό φυσιολογικές συνθήκες υπόκεινται σε αυστηρό έλεγχο, απορρυθμίζονται λόγω των διαδοχικών μεταλλάξεων (*Dihal et al., 2006*). Αυτές οι μεταλλάξεις ενδέχεται να συμβούν είτε σε γονίδια καταστολής των όγκων είτε σε ογκογόνα γονίδια (*Fodde, 2002*). Παρατηρείται υπερπλασία/ υπερπολλαπλασιασμός των κυττάρων, η οποία οδηγεί σε κυτταρική δυσπλασία σε ενιαίες κρύπτες με σταδιακή διεύρυνση και εξέλιξη από αδενωματώδεις πολύποδες σε καρκίνωμα (ακολουθία αδενώματος- καρκινώματος) με χαρακτηριστικές ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις (*Morson, 1974*).

Η ογκογένεση στο παχύ έντερο μπορεί να περιγραφεί με δυο μοντέλα. Το πρώτο είναι το μοντέλο «έναρξης- προαγωγής» κατά το οποίο, σε πρώτο στάδιο, λαμβάνει χώρα άμεση βλάβη στο DNA, η οποία, στη συνέχεια, οδηγεί σε μια σειρά μεταλλάξεων (έναρξη). Τα μεταλλαγμένα κύτταρα που επιβιώνουν από τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται και, αν οι μεταλλάξεις έχουν συμβεί σε σημεία βιολογικής σημασίας, εξελίσσονται σε καρκίνο, διαδικασία που ολοκληρώνεται με τη βοήθεια παραγόντων προαγωγής, οι οποίοι μόνοι τους δεν προκαλούν βλάβη στο DNA αλλά τροποποιούν τη βιολογική απόκριση (*Young et al., 2005*). Το δεύτερο μοντέλο είναι εκείνο της γονιδιωματικής αστάθειας πολλαπλών σταδίων, το οποίο χαρακτηρίζεται από ένα ευρύ φάσμα γενετικών αλλαγών που συσσωρεύονται τυχαία σε πολλαπλές θέσεις στο DNA, οδηγώντας σε γενετική αστάθεια σε πολλά σημεία (*Boland, 2003; Carethers & Boland, 2003*). Σε αυτό το μοντέλο, τα κύτταρα μπορεί να παραμένουν διπλοειδή ή να εντοπίζονται ανευπλοειδείς με θραύσματα χρωμοσωμάτων και άλλες βλάβες. Τα κύτταρα που φέρουν αυτές τις διαταραχές μπορούν να εκτοπίσουν τα φυσιολογικά κύτταρα.

Σε αντίθεση με άλλες μορφές καρκίνου, στον καρκίνο του παχέος εντέρου δεν υπάρχει κάποιος μεμονωμένος παράγοντας κινδύνου που να ευθύνεται για τα περισσότερα περιστατικά. Συνήθως εντοπίζονται περισσότεροι παράγοντες οι οποίοι συνυπάρχουν και αλληλεπιδρούν (*Brenner et al., 2014*). Οι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση καρκίνου του παχέος εντέρου διακρίνονται σε τροποποιήσιμους και μη τροποποιήσιμους. Στους μη τροποποιήσιμους παράγοντες ανήκουν το φύλο- το ανδρικό φύλο χαρακτηρίζεται από αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου- (*Bhat & East, 2015*), η ηλικία –όσο αυξάνεται η ηλικία (>50 έτη) αυξάνεται και ο κίνδυνος εμφάνισης με μέση ηλικία εμφάνισης τα 70 έτη στις ανεπτυγμένες χώρες (*Siegel et al., 2012; Brenner et al., 2014*), το οικογενειακό ιστορικό

για καρκίνο του παχέος εντέρου (*Taylor et al., 2010*), η παρουσία φλεγμονώδους νόσου του εντέρου (ΙΦΝΕ) (*Jess et al., 2012*), η προσβολή από το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (*Sonnenberg & Genta, 2013*) η συνύπαρξη σακχαρώδους διαβήτη (*Jiang et al., 2011*) και η ακρομεγαλία (*Bhat & East, 2015*). Από την άλλη πλευρά, στους τροποποιήσιμους παράγοντες, που αποτελούν και στόχο της πρωτοβάθμιας πρόληψης, συμπεριλαμβάνονται το κάπνισμα (*Liang et al., 2009*), η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ (*Fedirko et al., 2011*), η αυξημένη κατανάλωση κόκκινου και επεξεργασμένου κρέατος (*Chan et al., 2011*), δίαιτα υψηλή σε θερμίδες και λίπος (*Patterson et al., 2010*), το αυξημένο σωματικό βάρος και η παχυσαρκία (*Ma et al., 2013*).

Αξίζει να σημειωθεί, ότι υπάρχει σημαντική μεταβλητότητα όσον αφορά τη συχνότητα εμφάνισης της νόσου, η οποία είναι σε μεγάλο βαθμό γεωγραφικά- εξαρτώμενη, με τις Δυτικές ανεπτυγμένες κοινωνίες να εμφανίζουν τα μεγαλύτερα ποσοστά (Ευρώπη, Αμερική, Ωκεανία) (*Center et al., 2009; Baena & Salinas, 2015*). Αυτή η μεγάλη μεταβλητότητα επισημαίνει τον κυρίαρχο ρόλο που διαδραματίζουν οι περιβαλλοντικοί παράγοντες στην ανάπτυξη του καρκίνου γενικότερα αλλά και του καρκίνου του παχέος εντέρου ειδικότερα (*Anand et al., 2008*). Πιο συγκεκριμένα, θεωρείται πλέον βέβαιο ότι οι διατροφικές συνήθειες συνιστούν τον πιο σημαντικό παράγοντα κινδύνου μετά την ηλικία, το φύλο και τους κληρονομήσιμους παράγοντες, που θεωρούνται υπεύθυνοι μόνο για το 35% των περιπτώσεων καρκίνου του παχέος εντέρου (*Lichtenstein et al., 2000; Brenner et al., 2014*). Κατ' επέκταση, πρόκειται για έναν τύπο καρκίνου που μπορεί να χαρακτηριστεί ως διατροφικά εξαρτώμενος.

Από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας προκύπτει ότι για κάποια διατροφικά συστατικά η συσχέτιση με την εμφάνιση καρκίνου του παχέος εντέρου είναι επιβεβαιωμένη ενώ για κάποια άλλα τα αποτελέσματα παραμένουν αντικρουόμενα. Ειδικότερα, λοιπόν, έχει φανεί ότι το υπέρβαρο και η παχυσαρκία συσχετίζονται θετικά με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου καθώς και με αυξημένη θνησιμότητα από αυτήν (*Perera et al., 2012; Tárraga López et al., 2013*). Οι μηχανισμοί που μεσολαβούν αυτή τη σχέση θεωρείται ότι περιλαμβάνουν την εμφάνιση ινσουλινοαντίστασης και την επακόλουθη υπερινσουλιναίμια λόγω της συσσώρευσης κοιλιακού λίπους (*WCFR/AICR 2011*), την κυκλοφορία προφλεγμονωδών κυτταροκινών (TNF-α, IL-6, CRP) (*Baena & Salinas., 2015*) αλλά και ορμονών (ινσουλίνη, IGF-1, οιστρογόνα) (*Slattery & Fitzpatrick, 2009*) που δημιουργούν ευνοϊκό περιβάλλον για κακοήγη κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καρκινογένεση και αναστολή της κυτταρικής απόπτωσης όπως και αυξημένη

αγγειογένεση και μετάσταση (*John et al., 2006; Perrera et al., 2012*). Αποτελέσματα από πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι η υιοθέτηση υγιεινών προτύπων διατροφής που συμπεριλαμβάνουν υψηλή κατανάλωση φρούτων, λαχανικών και αφεψημάτων- άρα και υψηλή πρόσληψη φαινολικών συστατικών και βιταμινών E, A, C και φυλλικού οξέος- (*Aggarwal & Shishodia, 2006; Vauzour et al., 2010; Vargas & Thompson, 2012; Tárraga López et al., 2013*), δημητριακών ολικής άλεσης (*Romaneiro & Parekh, 2012*), λευκού κρέατος και ψαριών, προϊόντων σόγιας όπως και μικρής αλύσσου λιπαρών οξέων (*Dzierzewicz et al., 2002*), εμφανίζει προστατευτική δράση και οδηγεί σε μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου (*Aune et al., 2011; Yusof et al., 2012; Wu et al., 2012; Mocellin et al., 2015*).

Όσον αφορά στην αυξημένη πρόσληψη κόκκινου και επεξεργασμένου κρέατος (με έμφαση τόσο στην ποσότητα και τη συχνότητα κατανάλωσης όσο και στον τρόπο της μαγειρικής παρασκευής), τα αποτελέσματα επιδημιολογικών ερευνών υποστηρίζουν ότι οδηγούν σε αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου (*Smolinska & Paluszkiewicz, 2010; Chan et al., 2011*). Για τα γαλακτοκομικά προϊόντα, την πρόσληψη βιταμίνης D και ασβεστίου, τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα και δεν καταλήγουν σε κάποιο βέβαιο συμπέρασμα (*Aune et al., 2012; Ralston et al., 2014*). Η αυξημένη πρόσληψη αλκοόλ, επίσης, οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο και μάλιστα με δόσοεξαρτώμενο τρόπο (*Reidy et al., 2011; Tárraga López et al., 2014*) κυρίως λόγω αυξημένου οξειδωτικού στρες στον οργανισμό (*Durko & Malecka- Panas, 2014*). Ακόμη, αναφορικά με την επίδραση της φυσικής δραστηριότητας, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις που υποστηρίζουν ότι τακτική μέτρια προς έντονη σωματική δραστηριότητα δρα προστατευτικά κυρίως μέσω μηχανισμών που συμπεριλαμβάνουν την ενίσχυση του ανοσοποιητικού, την υποχώρηση της φλεγμονής αλλά και το μεταβολισμό διάφορων ορμονών και πρωτεϊνών (*Norat et al., 2010; Perrera et al., 2012; Kushi et al., 2012*). Τέλος, υπάρχουν αναφορές για ορισμένα φάρμακα, όπως οι στατίνες (*Lochhead & Chan, 2013*), τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη (ασπιρίνη) (*Bhat & East, 2015*), οι αναστολείς κυκλοξυγονάσης (*Ahmed, 2004; Half & Arber, 2009*) και οι ανταγωνιστές των PPAR υποδοχέων (*Pierzchalski et al., 2008*) ότι ελαττώνουν την πιθανότητα εμφάνισης αυτής της μορφής καρκίνου.

Όλα τα θρεπτικά συστατικά που αναφέρθηκαν προηγουμένως επιδρούν σε διάφορους μηχανισμούς που μεσολαβούν τη διαδικασία της καρκινογένεσης σε όλα τα στάδια. Η δυνατότητα τους αυτή να εκδηλώνουν τέτοιας μορφής δράση είναι γνωστή με τον όρο *χημειοπροστασία*, για την οποία θα γίνει εκτενής αναφορά σε επόμενο κεφάλαιο. Μάλιστα,

το 2011 αναφέρθηκε ότι η υιοθέτηση ενός υγιεινού τρόπου ζωής θα μπορούσε να μειώσει σε ποσοστό έως και 50% τα περιστατικά ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου στην Αμερική (WCFR/AICR, 2011; Kushi et al., 2012).

1.4 Μηχανισμοί Δράσης Φυτοχημικών ενάντια στην εμφάνιση διαφόρων μορφών καρκίνου- Αντικαρκινική- Χημειοπροστατευτική Δράση

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι βιολογικές δράσεις των φαρμακευτικών-αρωματικών φυτών αποδίδονται κατά κύριο λόγο στις βιοδραστικές χημικές ουσίες που περιέχουν, όπως είναι τα διάφορα ιχνοστοιχεία, οι βιταμίνες και οι δευτερογενείς μεταβολίτες (φυτοχημικά) (Issa et al., 2006). Τα τελευταία χρόνια, έχει πραγματοποιηθεί ένας μεγάλος αριθμός ερευνών με σκοπό την αποσαφήνιση των μηχανισμών μέσω των οποίων τα φυτοχημικά εκδηλώνουν προστατευτική δράση απέναντι σε διάφορες μορφές καρκίνου.

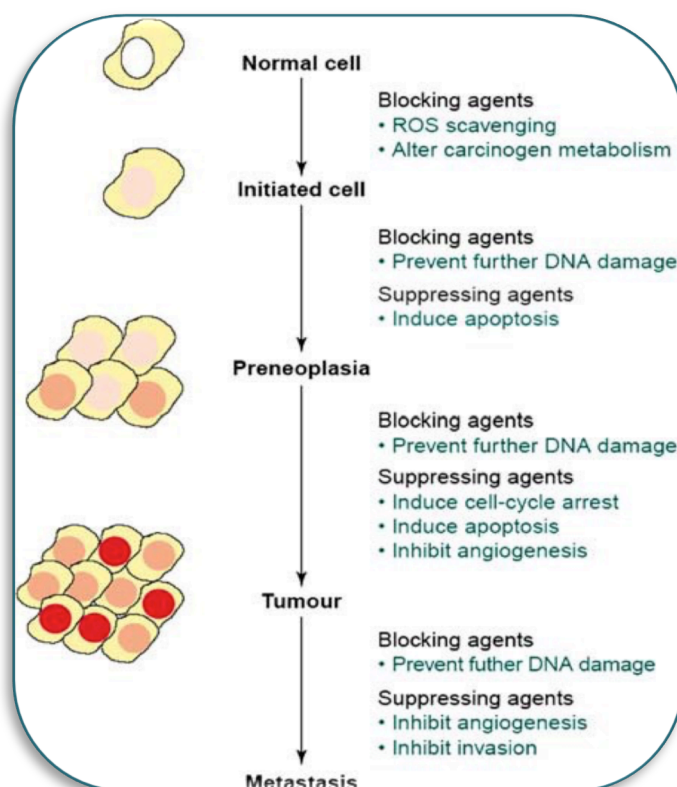
Ο όρος *χημειοπροστασία* εισήχθη το 1976 από τον Sporn ως μια στρατηγική για τη μείωση της επίπτωσης αλλά και την αντιμετώπιση του καρκίνου, η οποία αφορά σε πολλαπλά στάδια παρέμβασης (Sporn et al., 1976; Agarwal, 2001). Περιλαμβάνει τη χρήση μεμονωμένων ή συνδυασμού ελάχιστα ή καθόλου τοξικών φαρμακευτικών και διαιτητικών βιοπαραγόντων καθώς και φυτοχημικών και εκχυλισμάτων από ολόκληρα φυτά με στόχο την πρόληψη, τη διακοπή/αναστολή ή την αντιστροφή των κυτταρικών και μοριακών διαδικασιών της καρκινογένεσης (Issa et al., 2006; Neergheen et al., 2010; Su et al., 2013). Ανάλογα με το στάδιο κατά το οποίο διενεργείται η εκάστοτε παρέμβαση, η χημειοπροστασία διακρίνεται σε πρωτοβάθμια, δευτεροβάθμια και τριτοβάθμια (Issa et al., 2006). Η πρωτοβάθμια αφορά σε παρεμβάσεις με φαρμακευτικές ή διαιτητικές δραστικές ενώσεις με στόχο την πρόληψη του σχηματισμού προ-νεοπλασματικών αλλοιώσεων σε υγιή άτομα, τα οποία χαρακτηρίζονται, όμως, ως υψηλού κινδύνου (Khuri, 2003). Η δευτεροβάθμια στοχεύει σε άτομα που φέρουν ήδη προ-νεοπλασματικές αλλοιώσεις και, τέλος, η τριτοβάθμια απευθύνεται σε ασθενείς που έχουν εμφανίσει μια φορά καρκίνο και είναι σε κίνδυνο για δεύτερη εμφάνιση (van Zandwijk & Hirsch, 2003).

Συμβατικά, οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες ταξινομούνται σε παράγοντες αποκλεισμού (*blocking agents*) και σε παράγοντες καταστολής (*suppressing agents*). Οι παράγοντες αποκλεισμού (*blocking agents*) δρουν στο στάδιο έναρξης της ογκογένεσης (*initiation stage*) και μπορούν να προλαμβάνουν την εμφάνιση της βλάβης μέσω (α) αναστολής της ενεργοποίησης κάποιου καρκινογόνου, (β) παρεμπόδισης της αλληλεπίδρασής του με ζωτικά μακρομόρια του κυττάρου και, τέλος, (γ) επαγωγής ταχείας απενεργοποίησης και απομάκρυνσης του καρκινογόνου

από τον οργανισμό (Issa et al., 2006; de Kok et al., 2008). Οι παράγοντες καταστολής (*suppressing agents*), από την άλλη πλευρά, επιδρούν στα μεταγενέστερα στάδια (*later stages*) της καρκινογένεσης, δηλαδή, αυτά της προαγωγής, της εξέλιξης, της αγγειογένεσης και της μετάστασης (Liu, 2004). Οι παράγοντες αυτοί, στοχεύουν, όπως υποδηλώνει και το όνομα τους, στην καταστολή ή ακόμα καλύτερα στην εξάλειψη των καρκινικών κυττάρων με αναστολή της ικανότητάς τους για ανάπτυξη είτε μέσω διακοπής του κυτταρικού κύκλου είτε μέσω επαγωγής της διαδικασίας της απόπτωσης (de Kok et al., 2008).

Οι προτεινόμενοι κυτταρικοί μηχανισμοί μέσω των οποίων τα φυτοχημικά εκδηλώνουν χημειοπροστατευτική δράση, συμπεριλαμβάνουν οξειδωτικές ή ηλεκτροφιλικές τάσεις, οι οποίες μπορούν να ενεργοποιήσουν/προκαλέσουν ένα μεγάλο εύρος κυτταρικών γεγονότων. Σύμφωνα με τη σύγχρονη βιβλιογραφία, οι μηχανισμοί αυτοί είναι οι ακόλουθοι (Surh, 2003; Hu & Kong, 2004; Liu, 2004; Chen & Kong, 2005; Kwon et al., 2007):

1. Εκδήλωση αντιοξειδωτικής δράσης
2. Εκδήλωση αντιφλεγμονώδους δράσης
3. Αύξηση της έκφρασης ενζύμων αποτοξίνωσης ή αντιοξειδωτικών ενζύμων- Ρύθμιση των ενζύμων φάσης I και II



Εικόνα 1.5: Στάδια καρκινογένεσης και πιθανές επιδράσεις φυτοχημικών/πολυφαινολών (Ramos, 2007)

4. Αναστολή της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου
5. Αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού
6. Επαγωγή των διαδικασιών διαφοροποίησης και απόπτωσης
7. Αναστολή της έκφρασης και της λειτουργικής ενεργοποίησης ογκογονιδίων
8. Επαγωγή της έκφρασης γονιδίων καταστολής όγκων
9. Αναστολή της αγγειογένεσης και της μετάστασης μέσω τροποποίησης των μονοπατιών μεταγωγής σήματος/κυτταρικής σηματοδότησης

Οι παραπάνω μηχανισμοί και ιδιαίτερα αυτοί που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.

1.4.1 Εκδήλωση Αντιοξειδωτικής δράσης

Ο όρος *οξειδωτικό στρες* χρησιμοποιείται για να περιγράψει μια κατάσταση κατά την οποία σημειώνεται ανισορροπία μεταξύ των διαδικασιών παραγωγής και εξάλειψης/απομάκρυνσης των ελευθέρων ριζών και άλλων δραστικών μεταβολιτών (*Reuter et al., 2010*). Η ανισορροπία αυτή σημειώνεται όταν η κυτταρική συγκέντρωση των οξειδωτικών μορφών αυξάνεται σε τέτοιο βαθμό που υπερβαίνει το ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα άμυνας (*Dai & Mumper, 2010*). Αυτή η κατάσταση οδηγεί τελικά σε βλάβες σημαντικών βιομορίων αλλά και κυττάρων με πιθανή επίπτωση σε ολόκληρο τον οργανισμό (*Durackova, 2010; Reuter et al., 2010*). Τα παραπάνω μόρια είναι ευρύτερα γνωστά ως οξειδωτικές ουσίες, ως ελεύθερες ρίζες αλλά και ως δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) ενώ η εξάλειψη τους γίνεται μέσω προστατευτικών μηχανισμών, οι οποίοι μπορούν να αφορούν σε ενδογενή ή και εξωγενή αντιοξειδωτικά.

Η πλειοψηφία των ROS παράγεται στα κύτταρα όταν λαμβάνουν χώρα οι αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο στο επίπεδο της αναπνευστικής αλυσίδας στις μεμβράνες των μιτοχονδρίων (*Poyton et al., 2009*). Εκτός από τη μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, υπάρχουν και άλλες ενδογενείς πηγές παραγωγής ROS (*Krishnaiah et al., 2007*). Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται το σύστημα του κυτοχρώματος P-450, οξειδωτικά ένζυμα όπως η ενδοθηλιακή οξειδάση της ξανθίνης, οι NAD(P)H οξειδάσες των φαγοκυττάρων και οι μυελοϋπεροξειδάσες καθώς και οι οξυγονάσες του αραχιδονικού (*Bedard & Krause, 2007; Altenhöfer et al., 2012; Kleikers et al., 2012*). Ακόμη, διάφορες αντιδράσεις αυτο-οξείδωσης ενδογενών ουσιών όπως οι κατεχολαμίνες ή εξωγενών ουσιών όπως τα ξενοβιοτικά καθώς και η οξείδωση ανηγμένων μεταβολιτών που συσσωρεύονται, για παράδειγμα, κατά τη διαδικασία του αναερόβιου μεταβολισμού,

συγκαταλέγονται, επίσης, στις πηγές δημιουργίας σημαντικών ποσοτήτων ελευθέρων ριζών οξυγόνου (Kovacic et al., 2005; Lenaz, 2012). Στη βιβλιογραφία αναφέρεται, επίσης, ότι οι εξωγενείς παράγοντες που δύνανται να επάγουν το σχηματισμό ROS είναι η ακτινοβολία, οι ακτίνες γάμμα, διάφοροι αυξητικοί παράγοντες, οι κυτταροκίνες, η υποξία και η χημειοθεραπεία (Krishnaiah et al., 2007; Reuter et al., 2010).

Αναφορικά με το ρόλο τους σε φυσιολογικές καταστάσεις, οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) συμμετέχουν ενεργά στην επαγωγή σηματοδοτικών μονοπατιών αλλά και στη διαμεσολάβηση που αφορά την ενδοκυτταρική επικοινωνία σε φυτικά και ζωικά κύτταρα ως απόκριση σε αλλαγές στις ενδο- και εξωκυτταρικές περιβαλλοντικές συνθήκες (Armogida et al., 2012; Juránek et al., 2013; Nikitovic et al., 2013). Παραδείγματα φυσιολογικών μη επιβλαβών- εν αντιθέσει ωφέλιμων για το κύτταρο- λειτουργιών των ROS αποτελούν η συμμετοχή τους σε μηχανισμούς για τη διατήρηση της ομοιόστασης, η ρύθμιση της γονιδιακής μεταγραφής και η απομάκρυνση κυττάρων που χαρακτηρίζονται από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό μέσω επαγωγής της διαδικασίας της απόπτωσης (González- Flecha & Demple, 2000; Veskoukis et al., 2012).

Ταυτόχρονα, ωστόσο, είναι γνωστό ότι το μοριακό οξυγόνο φέρει υψηλό δυναμικό οξειδωσης με αποτέλεσμα να αντιπροσωπεύει ένα συνεχή και σταθερό κίνδυνο για ανεπιθύμητη οξείδωση ορίζοντας, έτσι, τον αερόβιο μεταβολισμό ως μια προϋπόθεση για μόνιμη οξειδωτική προσβολή (Beckman & Ames, 1998), η οποία ενδέχεται να επιφέρει ιστική καταστροφή ή να επηρεάσει την ικανότητα του ιστού να λειτουργεί φυσιολογικά (Kehrer et al., 1993; Krishnaiah et al., 2007). Εκτιμάται ότι κάτω από φυσιολογικές μεταβολικές συνθήκες περίπου 2-5% του οξυγόνου (O_2) που καταναλώνεται από τα μιτοχόνδρια μετατρέπεται σε δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) (Lopaczynsk & Zeisel, 2001).

Κατά τη διάρκεια των ενδογενών μεταβολικών αντιδράσεων, τα αερόβια κύτταρα παράγουν ROS, όπως το ανιόν του υπεροξειδίου (O_2^-), η ρίζα υδροξυλίου ($OH^\bullet$), η ρίζα υδροϋπεροξειδίου ($HOO^\bullet$), η ρίζα υπεροξειδίου ($ROO^\bullet$), η ρίζα αλκοξυλίου ($RO^\bullet$), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), τα υδροϋπεροξειδία των λιπιδίων ($ROOH$) και άλλα οργανικά υπεροξειδία όπως είναι τα φυσιολογικά προϊόντα που προκύπτουν από την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου (Reuter et al., 2010). Οι ελεύθερες ρίζες διαθέτουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια και έχουν την ικανότητα ανεξάρτητης ύπαρξης (Krishnaiah et al., 2007). Πρόκειται για ηλεκτρόφιλα μόρια με εκείνες που φέρουν ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο να είναι περισσότερο δραστικές, άρα και περισσότερο τοξικές, από

τις ελεύθερες ρίζες που φέρουν ζυγό αριθμό ηλεκτρονίων (*Issa et al., 2006*). Τα επιζήμια αποτελέσματα του μοριακού οξυγόνου είναι πιθανό να αποδίδονται στο σχηματισμό αυτών των δραστικών μορφών οξυγόνου (*Krishnaiah et al., 2007*). Κάτω από συνθήκες υποξίας, η μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα οδηγεί και στην παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO), το οποίο είναι σε θέση να δημιουργεί δραστικές μορφές αζώτου (RNS) (*Poyton et al., 2009*). Οι RNS με τη σειρά τους, παράγουν επιπλέον δραστικές μορφές όπως είναι, για παράδειγμα, το νιτρικό υπεροξείδιο (ONOO[•]), οι δραστικές αλδεϋδες-μηλονικές διαλδεϋδες και οι 4-εννεάλες, επάγοντας την υπερβολική υπεροξείδωση των λιπιδίων (*Hussain et al., 2003*).

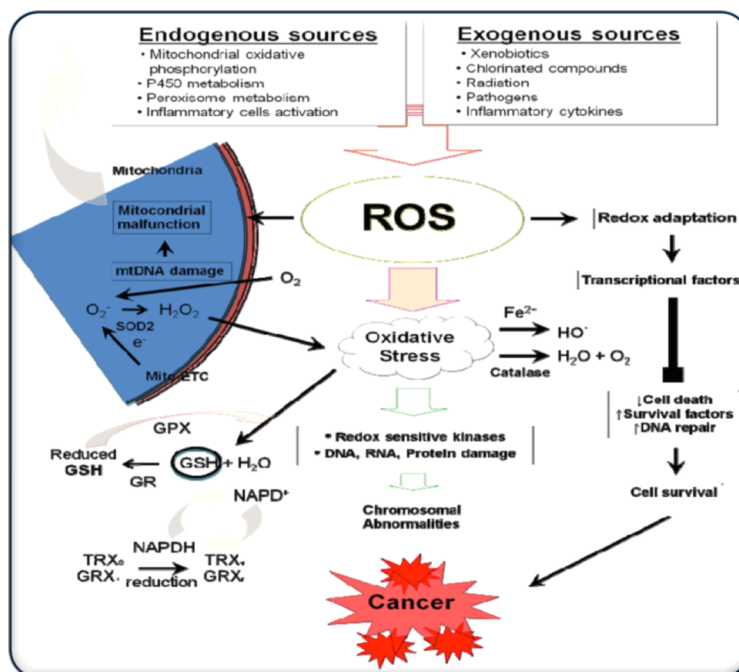
Οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA αποτελούν βιολογικά μακρομόρια-στόχους με τα οποία οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδρούν εύκολα, επάγοντας την οξειδωτική τους τροποποίηση και οδηγώντας, τελικά, στην απώλεια της πρωταρχικής τους λειτουργίας (*Bartosz, 2009; Lenaz, 2012*). Επιπρόσθετα, οι διάφορες τροποποιήσεις που είναι πιθανό να επέλθουν σε αυτά τα μόρια από την προαναφερθείσα διαδικασία αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης διαφόρων μεταλλάξεων, όπως είναι η υποκατάσταση βάσεων του DNA, η απαλοιφή, η μονή ή διπλή διάσπαση της έλικας ή διάφορες χρωμοσωμικές ανωμαλίες, οι οποίες αν δεν επιδιορθωθούν, ενδέχεται να επάγουν τη διαδικασία της καρκινογένεσης (*Barcellos, 2005; Issa et al., 2006; Reuter et al., 2010*). Ακόμη, τα λιπαρά οξέα των φωσφολιπιδικών μεμβρανών των κυττάρων είναι σε θέση να οξειδώνονται πολύ εύκολα με αποτέλεσμα να αποτελούν εξίσου στόχους της υπεροξειδικής επίθεσης των ελευθέρων ριζών, επιφέροντας αλλαγές στη διαπερατότητα αλλά και στη ρευστότητα των προσβαλλόμενων μεμβρανών (*Juránek et al., 2013*). Αυτές οι αλλαγές διαταράσσουν με τη σειρά τους τη λειτουργικότητα των μεμβρανικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των αντλιών ιόντων, η δραστηριότητα των οποίων εξαρτάται από το μεμβρανικό λιπιδικό περιβάλλον.

Οι παθολογικές καταστάσεις που έχουν συσχετιστεί με την παρουσία ελευθέρων ριζών και, μάλιστα, ως αιτιολογικού παράγοντα, χαρακτηρίζονται ως ασθένειες των ελευθέρων ριζών και αποτελούν μια ετερογενή ομάδα νοσημάτων (*Juránek et al., 2013*). Στα νοσήματα αυτά συμπεριλαμβάνονται η αθηροσκλήρωση, το σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας των ενηλίκων, η φλεγμονή, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, εκφυλιστικές παθήσεις όπως το γήρας, οι διαδικασίες μετάλλαξης και καρκινογένεσης, οι επιπλοκές που σχετίζονται με τον σακχαρώδη διαβήτη, οι βλάβες που σχετίζονται με το σύνδρομο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, οι επιπλοκές έπειτα από μεταμόσχευση οργάνων και

άλλα (Halliwell, 2007; Jaeschke, 2011; Reed, 2011). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, διατυπώθηκε η άποψη ότι τα εξωγενή αντιοξειδωτικά συστατικά μπορούν να λειτουργήσουν ως θεραπεία/αγωγή επιλογής για τις ανωτέρω παθήσεις, άποψη που επιβεβαιώνεται από πλήθος μελετών (Stagos et al., 2012; Aboul- Enein et al., 2013; Apostolou et al., 2013; Rodrigo et al., 2013).

Όταν επικρατούν συνθήκες εγκατεστημένου περιβαλλοντικού οξειδωτικού στρες, οι ROS παράγονται διαρκώς με αποτέλεσμα να αυξάνονται οι πιθανότητες πρόκλησης σοβαρής βλάβης τόσο στη δομή όσο και στη λειτουργία των κυττάρων και κατ' επέκταση να αυξάνονται οι πιθανότητες επαγωγής σωματικών μεταλλάξεων και νεοπλασματικών μετατροπών (Fang et al., 2009; Khandrika et al., 2009). Πράγματι, τόσο η έναρξη όσο και η προαγωγή του καρκίνου έχουν συσχετιστεί με την παρουσία οξειδωτικού στρες μέσω των αυξημένων μεταλλάξεων του DNA που σημειώνονται σε τέτοιες συνθήκες ή μέσω της επαγωγής βλάβης στο DNA, της γενετικής αστάθειας και της επίδρασης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Visconti & Grieco, 2009).

Προκειμένου ο οργανισμός να είναι σε θέση να ελέγχει την ισορροπία μεταξύ παραγωγής και απομάκρυνσης των ελευθέρων ριζών αλλά και να προστατευθεί από τα δυνητικά επιβλαβή προ-οξειδωτικά μόρια, διαθέτει ένα πλήθος αμυντικών μηχανισμών που είναι σε θέση να προλαμβάνουν το σχηματισμό των ελευθέρων ριζών, να τις αποτοξινώνουν αλλά και να επιδιορθώνουν τις βλάβες που προκαλούν (Timothy et al., 2003; Juránek et al., 2013). Στους αμυντικούς μηχανισμούς συμπεριλαμβάνονται επιδιορθωτικά ένζυμα του DNA, εξειδικευμένα αντιοξειδωτικά ένζυμα καθώς και μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά. Οι τρεις αυτοί μηχανισμοί συγχρονίζονται και λειτουργούν σε συνεργασία, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, δημιουργώντας ένα δίκτυο το οποίο κρίνεται ειδικό και αποτελεσματικό όσον αφορά στην προστασία των κυττάρων



Εικόνα 1.6: Ελεύθερες Ρίζες και Καρκινογένεση

(Venardos *et al.*, 2007; Bartosz, 2009) καθώς είναι σε θέση να αποτρέπει την επιβλαβή δράση των ROS (Juránek *et al.*, 2013). Στα επιδιορθωτικά ένζυμα συμπεριλαμβάνονται τόσο ένζυμα σύνθεσης όσο και αποικοδόμησης, όπως πρωτεάσες, πεπτιδάσες, φωσφολιπάσες, ενδο- και εξω-νουκλεάσες, πολυμεράσες, λιγάσες και ακυλο-τρανσφεράσες, τα οποία αποικοδομούν και εκκαθαρίζουν τα μακρομόρια που έχουν υποστεί βλάβη και τα αντικαθιστούν με νέα μόρια που συνθέτουν (Elliott *et al.*, 2000). Το ενδογενές ενζυμικό αντιοξειδωτικό σύστημα συνίσταται από την υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), την αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) και την καταλάση (CAT), καθένα ένζυμο από τα οποία καταλύει διαφορετική αντίδραση (Reuter *et al.*, 2010).

Πιο συγκεκριμένα, στα ανθρώπινα κύτταρα εκφράζονται τρεις μορφές υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD): η υπεροξειδική δισμουτάση που απαιτεί την παρουσία χαλκού και ψευδαργύρου (Zn/ Cu-SOD, στο κυτταρόπλασμα), εκείνη που απαιτεί την παρουσία μαγγανίου (Mn-SOD, στα μιτοχόνδρια) και η εξωκυτταρική δισμουτάση (EC-SOD). Όλες οι μορφές είναι σε θέση να καταλύουν την οξειδοαναγωγική αντίδραση κατά την οποία το ανιόν υπεροξειδίου ($O_2^{\bullet -}$) μετατρέπεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και μοριακό οξυγόνο (O_2) σύμφωνα με την αντίδραση:



Ακολούθως, δρα η καταλάση μετατρέποντας και αποτοξικοποιώντας το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) σε νερό (H_2O) και οξυγόνο (O_2):



Τέλος, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης μπορεί να ανάγει υδρο-υπεροξείδια-συμπεριλαμβανομένων των λιπιδικών υδρο-υπεροξειδίων-χρησιμοποιώντας την ανηγμένη μορφή της γλουταθειόνης ως υπόστρωμα (GSH) με την αντίδραση:



Η οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSSG) που προκύπτει από την προηγούμενη αντίδραση ανάγεται ξανά με τη δράση του ειδικού ενζύμου αναγωγή της γλουταθειόνης (Reuter *et al.*, 2010).

Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, στην προστασία του οργανισμού συμμετέχουν και μη-ενζυμικά αντιοξειδωτικά μόρια, όπως η γλουταθειόνη (GSH), οι βιταμίνες C (ασκορβικό οξύ), D και E (Reuter *et al.*, 2010). Όσον αφορά τη γλουταθειόνη (GSH), πρόκειται για ένα τριπεπτίδιο, το οποίο αποτελεί το κυριότερο ενδογενές αντιοξειδωτικό που παράγεται από τα κύτταρα συμβάλλοντας στην προστασία τους από τις ROS (Pompella *et al.*, 2003).

Επιπλέον, η γλουταθειόνη προστατεύει τα κύτταρα από βλάβες που προκαλούνται στο DNA εξαιτίας της παρουσίας των ROS και άλλων ηλεκτροφιλικών χημικών ουσιών ενώ είναι σε θέση να αποτοξινώνει καρκινογόνες ουσίες μέσω της φάσης II του μεταβολισμού με επακόλουθη απομάκρυνσή τους από τα κύτταρα (*Estrela et al., 2006; Valko et al., 2007*).

Τα αντιοξειδωτικά ορίζονται ως οι ουσίες εκείνες, οι οποίες όταν είναι παρούσες σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με τις αντίστοιχες των υπό οξείδωση υποστρωμάτων, είναι σε θέση να καθυστερούν σημαντικά, να αναστέλλουν ή και να προλαμβάνουν την οξείδωση αυτών των υποστρωμάτων μέσω εκκαθάρισης των ελευθέρων ριζών και μείωσης του οξειδωτικού στρες (*Halliwel & Gutteridge, 1989; Krishnaiah et al., 2007; Dai & Mumper, 2010*). Η αντιοξειδωτική δραστηριότητα των φαινολικών ενώσεων αποδίδεται στην ικανότητά τους (1) να εκκαθαρίζουν ελεύθερες ρίζες όπως οι ROS και RNS, (2) να αποτελούν δότες ατόμων υδρογόνου ή ηλεκτρονίων, (3) να καταστέλλουν το σχηματισμό των ROS και RNS μέσω της αναστολής ενζύμων ή μέσω της δημιουργίας χηλικών συμπλόκων με κατιόντα μετάλλων και (4) να επάγουν τη θετική ρύθμιση ή να προστατεύουν τους ενδογενείς μηχανισμούς άμυνας (*Cotelle, 2001; Amarowicz et al., 2004; Balasundram et al., 2006; Dai & Mumper, 2010*).

Η δομή των φαινολικών ενώσεων προσδιορίζει σε σημαντικό βαθμό την αντιοξειδωτική τους ικανότητα και αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως σχέση δομής-δραστηριότητας (SAR) (*Balasundram et al., 2006*). Έχει αναφερθεί μάλιστα ότι οι ενώσεις αυτές διαθέτουν ιδανική χημική δομή για εκκαθάριση ελευθέρων ριζών καθώς (*Dai & Mumper, 2010*): (α) διαθέτουν φαινολικές υδροξυλικές ομάδες, οι οποίες είναι επιρρεπείς στο να προσφέρουν άτομα υδρογόνου ή ηλεκτρόνια σε ελεύθερες ρίζες με μονήρη ηλεκτρόνια και (β) φέρουν εκτεταμένο συζευγμένο αρωματικό σύστημα που μπορεί να εκτοπίζει τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια.

Όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση των βιοδραστικών συστατικών των φυτικών εκχυλισμάτων και των βοτάνων, υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός μελετών που υποδεικνύουν ότι μέσω αυτής εκδηλώνουν και χημειοπροστατευτική δράση. Οι πολυφαινόλες έχουν προσελκύσει ιδιαίτερα το ενδιαφέρον των επιστημόνων λόγω της αφθονίας τους στη φύση αλλά και λόγω της αξιόλογης αντιοξειδωτικής τους ικανότητας (*Kris-Etherton et al., 2002*). Οι ομάδες υδροξυλίου που συνδέονται στον αρωματικό δακτύλιο που διαθέτουν, δημιουργούν ένα περιβάλλον πλούσιο σε ηλεκτρόνια τα οποία είναι σε θέση να παγιδεύουν τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) αποτρέποντας την αντίδρασή τους με πυρηνόφιλα κέντρα στις κυτταρικές πρωτεΐνες και το DNA (*Issa et al.,*

2006). Δυο είναι οι επικρατέστεροι μηχανισμοί μέσω των οποίων τα αντιοξειδωτικά συστατικά εκδηλώνουν χημειοπροστατευτική δράση: ο πρώτος, υποστηρίζει ότι τα συστατικά αυτά δρουν ως εκκαθαριστές των ελευθέρων ριζών και διακόπτουν την αλυσιδωτή αντίδραση οξείδωσης ενώ ο δεύτερος, βασίζεται στον ισχυρισμό ότι τα αντιοξειδωτικά συστατικά συμβάλλουν στην παραγωγή επιπλέον ελευθέρων ριζών προκαλώντας επιπλέον οξειδωτικό στρες στα κύτταρα και εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (οξειδωτική δράση) (Loo, 2003). Αξίζει να σημειωθεί, ωστόσο, ότι οι μηχανισμοί δράσης των διαφόρων φυτοχημικών ενδέχεται να είναι ειδικοί ανάλογα με το είδος των κυττάρων αλλά και να εξαρτώνται από τη συγκέντρωσή τους (δοσο-εξαρτώμενη σχέση) (Issa et al., 2006).

Οι φαινολικές ενώσεις (POH) δρουν ως αποδέκτες ελευθέρων ριζών και ως μορία που διακόπτουν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις των ριζών. Παρεμβαίνουν στην οξείδωση των λιπιδίων και άλλων μακρομορίων με ταχεία παροχή ενός ατόμου υδρογόνου στις ελεύθερες ρίζες (R), σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση (1) (Dai & Mumper, 2010):



Τα ενδιαμέσα της φαινοξυ- ρίζας ($PO^{\bullet}$) είναι σχετικά σταθερά λόγω συντονισμού και, επομένως, δεν εκκινείται εύκολα μια νέα αλυσιδωτή αντίδραση. Επιπλέον, τα ενδιαμέσα αυτά δρουν ως τερματιστές της οδού διάδοσης αντιδρώντας με άλλες ελεύθερες ρίζες, όπως φαίνεται στην αντίδραση (2) (Valko et al., 2006):



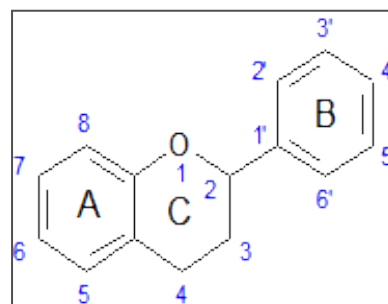
Υπάρχουν αρκετές σχέσεις μεταξύ δομής και αναγωγικού δυναμικού οι οποίες έχουν τεκμηριωθεί. Όσον αφορά τα φαινολικά οξέα και τους εστέρες τους, η αναγωγική ικανότητα εξαρτάται από τον αριθμό των ελεύθερων ομάδων υδροξυλίου στο μόριο. Τα υδροξυκιναμωμικά οξέα έχουν φανεί να είναι περισσότερο αποτελεσματικά συγκριτικά με τα υδροξυβενζοϊκά ομόλογα τους, πιθανώς λόγω της σταθεροποιητικής επίδρασης της ομάδας $-CH=CH-COOH$ (προπENOϊκού οξέος) που συνδέεται στο φαινολικό δακτύλιο με συντονισμό (Rice-Evans & Miller, 1996).

Για τα φλαβονοειδή, οι κυριότεροι παράγοντες που προσδιορίζουν την ικανότητα εκκαθάρισης ελευθέρων ριζών είναι οι ακόλουθοι (Bors & Michel, 2002; Schroeter et al., 2002; Valko et al., 2006):

- I. Η ορθο-διυδροξύ δομή στο B δακτύλιο, ο οποίος διαθέτει/φέρει τις βέλτιστες ιδιότητες όσον αφορά την παροχή ηλεκτρονίων, παρέχει υψηλότερη σταθερότητα και συμμετέχει στον απεντοπισμό των ηλεκτρονίων.

II. Ο 2,3 διπλός δεσμός με την α-4-οξο λειτουργική ομάδα στους δακτυλίους A και C, ο οποίος είναι απαραίτητος για την εκδήλωση μέγιστης ικανότητας εκκαθάρισης ελευθέρων ριζών.

III. Οι 3- και 5-υδροξυλ-ομάδες, οι οποίες είναι απαραίτητες για την εκδήλωση αντιοξειδωτικής δράσης κυρίως μέσω σχηματισμού χηλικών συμπλόκων. Η γλυκοζυλίωση στη θέση 3 μειώνει τη δραστηριότητα των φλαβονοειδών όταν αυτά συγκρίνονται με τις αντίστοιχες μη γλυκοζυλιωμένες μορφές.



Εικόνα 1.7 :Γενική Δομή
Φλαβονοειδών

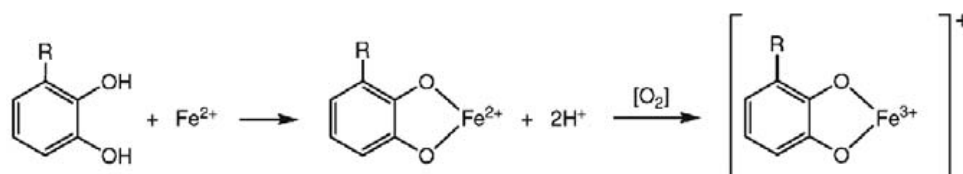
Για παράδειγμα, η κερκετίνη που ανήκει στις φλαβονόλες, συνιστά μια ένωση που φέρει όλα τα χημικά χαρακτηριστικά που αναφέρθηκαν παραπάνω ενώ οι ανθοκυανίνες αντιδρούν έντονα με τις ROS και RNS χάρη στην ιδιαίτερη χημική τους δομή που χαρακτηρίζεται από έλλειμμα ηλεκτρονίων (*Dai & Mumper, 2010*).

Η ικανότητα ορισμένων φαινολικών ενώσεων με διυδροξυ- ομάδες να δημιουργούν χηλικά σύμπλοκα (σύζευξη) με μέταλλα μετάβασης συνιστά μια ακόμη αντιοξειδωτική ιδιότητα, καθώς προλαμβάνει τον επαγόμενο από τα μέταλλα σχηματισμό ελευθέρων ριζών οξυγόνου και αζώτου. Τα οξειδοαναγωγικά ενεργά ιόντα μετάλλων όπως είναι τα Cu^{2+} και Fe^{2+} μπορούν να αντιδρούν με το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) μέσω της αντίδρασης Fenton (αντίδραση (3)) οδηγώντας στο σχηματισμό ριζών υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$), δηλαδή των πιο δραστικών μορφών ελευθέρων ριζών, οι οποίες είναι σε θέση να εκκινήσουν αλυσιδωτές αντιδράσεις ελευθέρων ριζών αποσπώντας ηλεκτρόνια σχεδόν από οποιοδήποτε μόριο (*Dai & Mumper, 2010*). Η μεσολαβούμενη από τα μέταλλα παραγωγή ROS και NOS οδηγεί σε βλάβες στο DNA αλλά και στην υπεροξείδωση των λιπιδίων (*Valko et al., 2006*).

Όσον αφορά το σίδηρο, υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι τα αυξημένα επίπεδά του στον οργανισμό συσχετίζονται με το σχηματισμό ROS αλλά και με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου λόγω του γεγονότος ότι παρουσία αυτού του μετάλλου τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσονται ταχύτατα (*Siah et al., 2005; Valko et al., 2006*). Ο χαλκός αποτελεί απαραίτητο συστατικό αρκετών ενδογενών αντιοξειδωτικών ενζύμων. Είναι γνωστό ότι παρουσία αυξημένων συγκεντρώσεων χαλκού, διευκολύνεται ο

κυτταρικός πολλαπλασιασμός με αποτέλεσμα ο κίνδυνος καρκινογένεσης να είναι αυξημένος (*Wu et al., 2004; Valko et al., 2006*).

Οι φαινολικές ενώσεις που φέρουν στο μόριο τους ομάδες γαλλικού οξέος ή κατεχόλης μπορούν να αποτρέψουν το σχηματισμό ριζών οξυγόνου από τα μέταλλα είτε μέσω συντονισμού με το Fe^{2+} και επαγωγής της αυτο-οξειδωσης του (αντίδραση (4)) είτε μέσω σχηματισμού αδρανών συμπλόκων με Cu^{2+} , Fe^{2+} ή Cu^+ με σχετικά ασθενέστερη αντίδραση (*Perron & Brumaghim, 2009*). Η σύνδεση μεταλλικών ιόντων στο μόριο των φλαβονοειδών μπορεί να γίνει μέσω (α) 3',4'-ο-διφαινολικών ομάδων στο Β δακτύλιο, (β) 3,4- ή 3,5-ο-διφαινολικών ομάδων και των δομών κετόλης (οργανική ένωση με μια ομάδα κετόνης και μια ομάδα αλκοόλης) 4-κετο,3-υδροξυ- ή 4-κετο,5-διυδροξυ- ομάδων στον C δακτύλιο (*Rice-Evans et al., 1997*). Στη βιβλιογραφία, αναφέρεται, επίσης, ότι η βέλτιστη αντιοξειδωτική ικανότητα και ικανότητας σύμπλεξης με ιόντα συσχετίζεται με δομές που περιέχουν υδροξυ-κετο-ομάδες (3-OH- ή 5-OH- με ομάδα 4-C=O) καθώς και με την παρουσία μεγάλου αριθμού ομάδων κατεχόλης/ γαλλικού (*Khokhar & Apenten, 2003*).



Αναφορικά με την επίδραση των εξωγενών αντιοξειδωτικών ενώσεων στα ενδογενή αντιοξειδωτικά ένζυμα, μελέτες υποστηρίζουν ότι αυτά είναι σε θέση να επάγουν την αύξηση της έκφρασης των ενζύμων του ενδογενούς αμυντικού μηχανισμού όπως της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) και της καταλάσης αλλά και να αναστέλλουν την έκφραση ενζύμων όπως η οξειδάση της ξανθίνης που συνεισφέρουν στην παραγωγή ROS (*Disilvestro, 2001; Du et al., 2007; Tsao, 2010*). Έχει διατυπωθεί, επίσης, η άποψη ότι τα ίδια τα εξωγενή αντιοξειδωτικά ενδέχεται να προκαλούν επιπλέον οξειδωτικό στρες σε μικρό βαθμό και μέσω αυτού να επάγουν την έκφραση των αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως συμβαίνει, για παράδειγμα, με τις πολυφαινόλες από το πράσινο τσάι (*Rahman et al., 2006; Lambert & Elias, 2010*).

Θεωρητικά, οι τρεις προαναφερθείσες αντιοξειδωτικές δράσεις μπορούν να προκαλέσουν μείωση των σταθερών συγκεντρώσεων των ελευθέρων ριζών και των δραστικών μορφών οξυγόνου. Ως αποτέλεσμα αναμένεται να μειωθεί η επακόλουθη οξείδωση των μορίων-στόχων, όπως είναι οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και τα νουκλεϊκά οξέα

(Dai & Mumper, 2010). Με βάση αυτές τις δυνητικές ικανότητες των φυσικών φαινολικών συστατικών, πλήθος μελετών καταδεικνύουν την ικανότητά τους να εκδηλώνουν αντιοξειδωτική αλλά και χημειοπροστατευτική δράση σε πολλά βιολογικά αλλά και *ex vivo* συστήματα, όπως για παράδειγμα, σε απομονωμένες λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL), σε συνθετικές μεμβράνες, σε *ex vivo* ανθρώπινο πλάσμα και κυτταρικές καλλιέργειες (Fraga, 2007; Kampa et al., 2007). Επιπρόσθετα, έχουν παρατηρηθεί αμοιβαία συνεργιστικά αποτελέσματα μεταξύ διαφορετικών φαινολικών ενώσεων ή μεταξύ φαινολικών ενώσεων και άλλων μη-φαινολικών αντιοξειδωτικών και, πλέον, είναι γενικά αποδεκτό ότι ο συνδυασμός φαινολικών ή άλλων αντιοξειδωτικών επιδεικνύει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα από καθαρά μεμονωμένες ενώσεις (Dai & Mumper, 2010).

Αξίζει να σημειωθεί ότι ορισμένα φαινολικά αντιοξειδωτικά μπορούν να εκκινήσουν μια διαδικασία αυτο-οξείδωσης και να συμπεριφερθούν ως *προ-οξειδωτικά μόρια* κάτω από ορισμένες συνθήκες, όπως για παράδειγμα σε συνθήκες υψηλού pH, σε υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων μετάλλων μετάβασης, σε υψηλές συγκεντρώσεις των ίδιων των αντιοξειδωτικών και παρουσία μοριακού οξυγόνου (Valko et al., 2006). Μικρές φαινολικές ενώσεις που οξειδώνονται εύκολα, όπως για παράδειγμα, η κερκετίνη, η απιγενίνη, η ρουτίνη, το γαλλικό οξύ και το καφεϊκό οξύ κατέχουν προ-οξειδωτική δραστηριότητα και είναι δυνατό να προκαλέσουν οξειδωτική διάσπαση του κλώνου του DNA ενώ οι φαινολικές ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους, όπως οι συμπυκνωμένες ταννίνες και εκείνες που μπορούν να υποστούν υδρόλυση, εκδηλώνουν μόνο μικρή ή και καθόλου προ-οξειδωτική δράση (Azmi et al., 2006; Dai & Mumper, 2010). Στην περίπτωση αυτή, οι φαινόξυ-ρίζες αντί να τερματίζουν την αλυσιδωτή αντίδραση οξείδωσης των ελευθέρων ριζών μέσω αντίδρασης με μια δεύτερη ρίζα, αντιδρούν και αυτές με το οξυγόνο και παράγουν κινόνες ($P=O$) και ανιόν υπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$), όπως φαίνεται στην ακόλουθη αντίδραση (Cotelle, 2001; Dai & Mumper, 2010):



Επιπλέον, υποστηρίζεται ότι και τα ιόντα μεταβατικών μετάλλων είναι σε θέση να επάγουν προ-οξειδωτική δράση των φαινολικών αντιοξειδωτικών, σύμφωνα με τις παρακάτω αντιδράσεις:





Έχει αναφερθεί, όμως, ότι η δράση των αντιοξειδωτικών ουσιών ως προ-οξειδωτικά ενδέχεται να αποτελεί έναν από τους τρόπους εκδήλωσης της ανασταλτικής τους δράσης στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (*Dai & Mumper, 2010*).

Από τα παραπάνω γίνεται σαφές ότι ενώσεις όπως τα φυτοχημικά που είναι σε θέση να εκδηλώνουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση εναντίον των ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS), μπορούν να συμβάλλουν στην πρόληψη ή και την αντιμετώπιση του καρκίνου καθώς πρόκειται για μια νόσο που συνδέεται άμεσα με την παρουσία των επιβλαβών αυτών μορίων.

1.4.2 Εκδήλωση Αντιφλεγμονώδους δράσης

1.4.2.1. Γενικά Στοιχεία

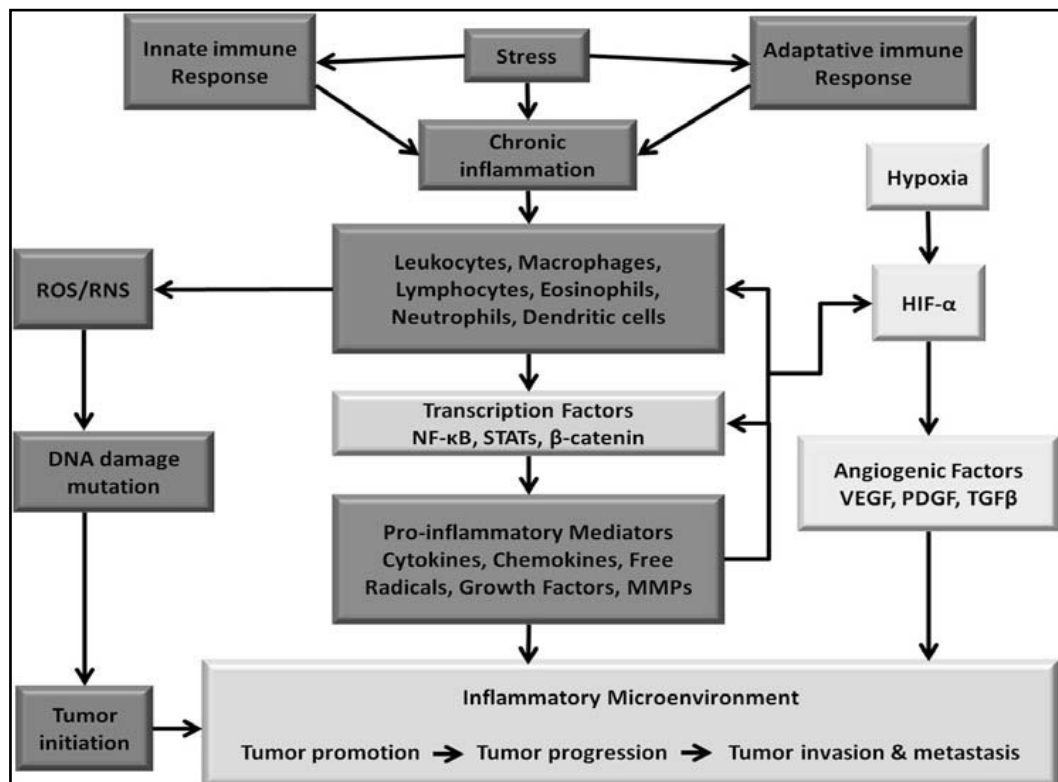
Η λειτουργική σχέση μεταξύ φλεγμονής και καρκίνου αναγνωρίστηκε και τεκμηριώθηκε πριν πολλές δεκαετίες (*Kraus & Arber, 2009*). Πρόσφατα επιδημιολογικά δεδομένα αναφέρουν ότι 25% όλων των μορφών καρκίνου σχετίζονται με καταστάσεις χρόνιων λοιμώξεων και άλλες μορφές φλεγμονής (*Vendramini- Costa & Carvalho., 2012*). Σε ορισμένους τύπους καρκίνου, οι προϋπάρχουσες συνθήκες φλεγμονής είναι εκείνες που οδηγούν σε μια κακοήγη μεταβολή ενώ σε άλλες μορφές, μια ογκογονιδιακή μεταβολή επάγει τη δημιουργία φλεγμονώδους μικροπεριβάλλοντος, το οποίο, τελικά, προωθεί την ανάπτυξη του όγκου συμβάλλοντας στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση, προάγοντας την αγγειογένεση και τη μετάσταση, μεταστρέφοντας τις προσαρμοστικές ανοσοποιητικές αποκρίσεις και μεταβάλλοντας την απόκριση σε ορμόνες και χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (*Mantovani et al., 2009*).

Η σχέση αυτή βασίστηκε σε έναν σημαντικό αριθμό παρατηρήσεων και πειραματικών δεδομένων (*Mantovani et al., 2008; Grivennikov et al., 2010; Grivennikov & Karin, 2010*):

1. Οι όγκοι δημιουργούνται σε σημεία όπου εντοπίζεται χρόνια φλεγμονή (*Bartsch & Nair, 2006*). Έχει αναφερθεί ότι όσο μεγαλύτερο είναι το χρονικό διάστημα που εμμένει η φλεγμονή, τόσο αυξάνεται ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου (*Reuter et al., 2010*).
2. Τα φλεγμονώδη κύτταρα, οι χημειοκίνες και οι κυτταροκίνες εντοπίζονται σε όλες τις μορφές καρκίνου (*Rollins, 2006*).

3. Η υπερέκφραση χημειοκινών και κυτταροκινών μπορούν να επάγουν την καρκινογένεση.
4. Τόσο στη φλεγμονή όσο και στη διαδικασία εξέλιξης του καρκίνου ενεργοποιούνται και απενεργοποιούνται τα ίδια κυτταρικά μονοπάτια με κοινούς μοριακούς στόχους.
5. Ένα μεγάλο πλήθος επιδημιολογικών μελετών έχει αποδείξει ότι η παρουσία χρόνιας φλεγμονής αυξάνει τον κίνδυνο για εμφάνιση διαφόρων μορφών καρκίνου.
6. Τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (NSAIDs) που χρησιμοποιούνται ως θεραπευτική αγωγή σε καταστάσεις φλεγμονής είναι αποτελεσματικά όσον αφορά στη μείωση της επίπτωσης και της θνησιμότητας από πολλές μορφές καρκίνου (Chan et al., 2007; Gonda et al., 2009).

Στην Εικόνα 1.8 παρουσιάζεται σχηματικά η σχέση μεταξύ φλεγμονής και καρκινογένεσης.



Εικόνα 1.8: Σχηματική παρουσίαση της σχέσης μεταξύ φλεγμονής και καρκινογένεσης (Vendramini-Costa & Carvalho, 2012).

Παράγοντες που δύνανται να επάγουν την έναρξη μιας φλεγμονώδους αντίδρασης είναι οι μικροβιακές και βακτηριακές λοιμώξεις, η έκθεση σε αλλεργιογόνα, η ακτινοβολία, διάφορες τοξικές χημικές ουσίες, οι αυτοάνοσες και χρόνιες παθήσεις, οι δίαιτες υψηλού θερμιδικού περιεχομένου και η παχυσαρκία καθώς και η κατανάλωση αλκοόλ και

προϊόντων καπνού (*Aggarwal et al., 2009; Schetter et al., 2010*). Η φλεγμονή διακρίνεται σε δυο στάδια, την οξεία και τη χρόνια. Ο όρος οξεία φλεγμονή χρησιμοποιείται για να περιγράψει ένα αρχικό στάδιο φλεγμονώδους κατάστασης (εγγενής- φυσική ανοσία), η οποία μεσολαβείται από την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος, έχει μικρή διάρκεια και, συνήθως, είναι ευεργετική για τον ξενιστή. Στην περίπτωση που η φλεγμονή είναι παρούσα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, επέρχεται το δεύτερο στάδιο, αυτό της χρόνιας φλεγμονώδους κατάστασης, το οποίο χαρακτηρίζεται από συνεχή ενεργή φλεγμονώδη απόκριση και ιστική καταστροφή και ενδέχεται να προδιαθέτει τον ξενιστή για ποικίλες χρόνιες νόσους συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου (*Lin & Karin, 2007; Kraus & Arber, 2009*).

Ο ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος κατά τη διαδικασία της ανάπτυξης του καρκίνου είναι πολύπλοκος και αποτελεί πεδίο έντονης έρευνας (*Coussens & Werb, 2002; de Visser et al., 2008; Gonda et al., 2009; Reuter et al., 2010*). Είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι το μικροπεριβάλλον του όγκου, το οποίο διαμορφώνεται σε πολύ μεγάλο βαθμό από τα φλεγμονώδη κύτταρα, αποτελεί απαραίτητο συμπράγοντα στη νεοπλασματική διαδικασία προωθώντας τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, την επιβίωση και τη μετανάστευση τους μέσω της κινητοποίησης σηματοδοτικών μορίων του ανοσοποιητικού συστήματος όπως οι σελεκτίνες, οι χημειοκίνες και οι υποδοχείς αυτών προς όφελος του όγκου (*Coussens & Werb, 2002; Balkwill et al., 2005*). Οι πιθανοί μηχανισμοί που μεσολαβούν αυτή τη σχέση συμπεριλαμβάνουν τις εκτεταμένες αμοιβαίες αλληλεπιδράσεις μεταξύ γενετικά τροποποιημένων κυττάρων, προσαρμοστικών και εγγενών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (μακροφάγα, ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα), των διαλυτών μεσολαβητών τους (κυτταροκίνες, χημειοκίνες) καθώς και των δομικών συστατικών τους που είναι παρόντα στο μικροπεριβάλλον του όγκου (*de Visser et al., 2008; Seruga et al., 2008*), την επαγωγή γενετικής αστάθειας, τις αλλαγές σε επιγενετικά γεγονότα και την επακόλουθη ακατάλληλη έκφραση γονιδίων, τον αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό των αρχικών καρκινικών κυττάρων, την αντίσταση των κυττάρων στην απόπτωση, την επιθετική δημιουργία νέων αγγείων (αγγειογένεση), τη διείσδυση του όγκου μέσω της βασικής μεμβράνης και τη μετάσταση (*Kundu & Surh, 2008*).

Η φλεγμονή, όπως και ο καρκίνος, είναι μια κατάσταση στην οποία εμπλέκεται το οξειδωτικό στρες, που αναφέρθηκε νωρίτερα (*Reuter et al., 2010*). Κατά τη διάρκεια της φλεγμονής τα σιτευτικά κύτταρα και τα λευκοκύτταρα μεταναστεύουν στο σημείο

εντοπισμού της βλάβης και παρατηρείται αυξημένη πρόσληψη οξυγόνου και, κατά συνέπεια, αυξημένη απελευθέρωση και συσσώρευση δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) (Coussens & Werb, 2002). Παράλληλα, τα φλεγμονώδη κύτταρα παράγουν διαλυτούς παράγοντες μεσολάβησης, όπως μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέος, κυτταροκίνες και χημειοκίνες, οι οποίοι στρατολογούν επιπλέον φλεγμονώδη κύτταρα στο σημείο της βλάβης. Οι μεσολαβητές αυτοί είναι σε θέση να ενεργοποιούν καταρράκτες μεταγωγής σήματος και να επάγουν μεταβολές σε μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο πυρηνικός παράγοντας NF-κΒ, ο μεταγωγέας σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής 3 (STAT3), ο επαγόμενος από την υποξία παράγοντας 1α (HIF-1α), η ενεργοποιούσα πρωτεΐνη-1 (AP-1), ο πυρηνικός παράγοντας των ενεργοποιημένων T κυττάρων και ο σχετιζόμενος με τον NF-E2 παράγοντας-2 (Nrf2), οι οποίοι μεσολαβούν άμεσες απαντήσεις σε καταστάσεις κυτταρικού στρες. Επιπλέον, άλλοι παράγοντες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της επαγόμενης από το οξειδωτικό στρες φλεγμονής και οι οποίοι αναφέρονται στη βιβλιογραφία είναι η επαγωγή της κυκλοξυγονάσης 2 (COX-2) και της επαγόμενης συνθάσης του νιτρικού οξειδίου (iNOS), η παρεκκλίνουσα έκφραση φλεγμονωδών κυτταροκινών (TNF-α, IL-1, IL-6) και χημειοκινών (IL-8, υποδοχέας-4 χημειοκινών CXCR4) καθώς και οι αλλαγές στην έκφραση συγκεκριμένων microRNAs (Hussain & Harris, 2007; Reuter et al., 2010). Η εγκατάσταση ενός τέτοιου φλεγμονώδους και οξειδωτικού περιβάλλοντος οδηγεί στη δημιουργία ενός φαύλου κύκλου που είναι δυνατό να προκαλέσει βλάβη σε υγιή γειτονικά επιθηλιακά και στρωματικά κύτταρα και σε βάθος χρόνου να καταλήξει σε καρκινογένεση (Federico et al., 2007).

Προφλεγμονώδεις Κυτταροκίνες- Χημειοκίνες

Η παρουσία κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος σε όλες τις μορφές κακοήθους όγκου έχει πλέον τεκμηριωθεί. Τα κύτταρα αυτά σχηματίζουν φλεγμονώδεις διηθήσεις στο νεοπλασματικό ιστό και έχουν ευρύ αντίκτυπο όσον αφορά στην έναρξη, την ανάπτυξη και την προαγωγή του καρκίνου (Grivennikov & Karin, 2011). Σημαντικό ρόλο σε αυτήν τη διαδικασία διαδραματίζει και το πολύπλοκο δίκτυο προ-φλεγμονωδών και αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών, ουσίες που απελευθερώνονται από την προαναφερθείσα ομάδα κυττάρων και οι οποίες δρουν συνεργιστικά στα διάφορα στάδια της ογκογένεσης (Seruga et al., 2008). Τα μόρια αυτά -κυτταροκίνες- που απελευθερώνονται ως απόκριση σε καταστάσεις μόλυνσης, φλεγμονής αλλά και ανοσίας δύνανται να λειτουργήσουν ως ανασταλτικοί παράγοντες για την εξέλιξη και την προαγωγή του όγκου. Εναλλακτικά, τα καρκινικά κύτταρα ενδέχεται να ανταποκριθούν στις κυτταροκίνες που

απελευθερώνονται από τον ξενιστή, οι οποίες δρουν προάγοντας την ανάπτυξη, περιορίζοντας την απόπτωση και διευκολύνοντας την εισβολή και τη μετάσταση (*Dranoff, 2004*). Μεταξύ αυτών των ουσιών, ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων (TNF-α) και η ιντερλευκίνη 6 (IL-6), που εκδηλώνουν προ-ογκογονική δράση και, παράλληλα, αποτελούν τους βασικότερους ρυθμιστικούς παράγοντες της σχετιζόμενης με τον καρκίνο φλεγμονή (*Grivennikov & Karin, 2011*), είναι εκείνες που έχουν μελετηθεί περισσότερο.

Ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων (TNF-α) αποτελεί μια προφλεγμονώδη κυτταροκίνη που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της φλεγμονής (*Kwon et al., 2007*). Εμπλέκεται σε διάφορες βιολογικές λειτουργίες όπως η ανάπτυξη ιστών, η τροποποίηση της διαπερατότητας του επιθηλιακού φραγμού, η αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας, η ενεργοποίηση των μακροφάγων, η επιστράτευση φλεγμονωδών κυττάρων και η θετική ρύθμιση στα κυτταρικά μόρια προσκόλλησης (*Aggarwal, 2003*). Η επαγωγή της έκφρασης προ-φλεγμονωδών γονιδίων από τον TNF-α έχει συσχετισθεί με μια πληθώρα παθολογικών καταστάσεων. Αυτές οι προφλεγμονώδεις επιδράσεις του TNF-α αποδίδονται κυρίως στην ικανότητά του να ενεργοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα NF-κΒ οδηγώντας στην έκφραση φλεγμονωδών γονιδίων όπως της κυκλοξυγονάσης-2 (COX-2), της λιποξυγονάσης-2 (LOX-2), μορίων προσκόλλησης, φλεγμονωδών κυτταροκινών, χημειοκινών και της συνθάσης του οξειδίου του αζώτου (iNOS). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι αποτελεί αυξητικό παράγοντα για τα περισσότερα καρκινικά κύτταρα και ότι μεσολαβεί διάφορα στάδια της καρκινογένεσης όπως η έναρξη, η προαγωγή και η μετάσταση (*Aggarwal & Shishodia, 2006*).

Λόγω αυτού του κρίσιμου ρόλου του TNF-α, ενώσεις που είναι σε θέση να αναστέλλουν την δράση του θα μπορούσαν να αποτελούν αντικαρκινικούς παράγοντες. Ουσίες όπως η απιγενίνη, η καμπφερόλη, η ρεσβερατρόλη και οι πολυφαινόλες του πράσινου τσαγιού έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την έκφραση και την παραγωγή του TNF-α (*Kowalski et al., 2005; Martin et al., 2006*).

Η ιντερλευκίνη-6 (IL-6) αποτελεί μια αντιαποπτωτική φλεγμονώδη κυτταροκίνη που διαδραματίζει πρωταρχικό ρόλο στην ανάπτυξη των κυττάρων. Συνιστά, επίσης, ένα από τα βασικά σήματα-τελεστές του ενεργοποιημένου παράγοντα NF-κΒ που προάγει τη νεοπλασία (*Germano et al., 2008; Naugler & Karin, 2008*). Στο μικροπεριβάλλον του όγκου εντοπίζονται, επίσης, η ιντερλευκίνη 1 (IL-1) που επάγει την αγγειογένεση καθώς και οι ανοσοκατασταλτικές ιντερλευκίνες 10 (IL-10) και 23 (IL-23) (*Coussens & Werb, 2002; Germano et al., 2008*).

Οι χημειοκίνες αποτελούν μια οικογένεια πρωτεϊνών μικρού μοριακού βάρους που παρουσιάζουν υψηλού βαθμού δομική ομολογία και έχουν την ικανότητα να προσελκύουν και να συσσωρεύουν διάφορους τύπους λευκοκυττάρων στα σημεία που εντοπίζεται φλεγμονή (Mantovani et al., 2004; Rollins, 2006). Σε πολλές μορφές καρκίνου παρατηρείται η έκφραση ενός εκτεταμένου δικτύου χημειοκινών αλλά και υποδοχέων αυτών (Balkwill & Mantovani, 2001; Murphy, 2001; Vicari & Caux, 2002). Αυτές οι μορφές καρκίνου χαρακτηρίζονται από απορρυθμισμένη παραγωγή χημειοκινών καθώς και από διαταραγμένη σηματοδότηση αλλά και έκφραση των υποδοχέων των χημειοκινών αυτών (Dhawan & Richmond, 2002; Skinnider & Mak, 2002).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι σχετιζόμενες με τους όγκους χημειοκίνες, εκδηλώνουν τη δράση τους μετά την πρόσδεσή τους στους αντίστοιχους υποδοχείς και επιτελούν πολλούς διαφορετικούς βιολογικούς ρόλους τόσο στο πρωταρχικό στάδιο εμφάνισης του όγκου όσο και στο στάδιο της μετάστασης (Aggarwal & Shishodia, 2006). Μάλιστα, τα τελευταία δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι βιολογικές δράσεις που ασκούνται από τις χημειοκίνες στο μικροπεριβάλλον του όγκου συνεισφέρουν σε μεγαλύτερο βαθμό στην ανάπτυξη και την εξάπλωση του όγκου από όσο στην αντинеοπλασματική απόκριση του ξενιστή. Πιο συγκεκριμένα, ο ρόλος των χημειοκινών αφορά: (α) στην επαγωγή βλάβης στο DNA από τις ROS/RNS, (β) στην αναστολή των επιδιορθωτικών μηχανισμών του DNA μέσω των ROS/RNS, (γ) στον έλεγχο της διεισδυτικής ικανότητας των λευκοκυττάρων στο εσωτερικό του όγκου, (δ) στη διαχείριση της ανοσολογικής απόκρισης του όγκου, (ε) στην ενεργοποίηση των MMPs και στη ρύθμιση της αγγειογένεσης, (στ) στη δράση τους ως αυτοκρινείς ή παρακρινείς αυξητικοί παράγοντες ή παράγοντες επιβίωσης και (ι) στον έλεγχο της κίνησης των ίδιων των καρκινικών κυττάρων και στην τροποποίηση των μορίων προσκόλλησης (Balkwill, 2003; Neergheen et al., 2010).

Έχει αναφερθεί ότι η παρουσία λευκοκυττάρων σε συμπαγείς όγκους σχετίζεται με την παραγωγή χημειοκινών τοπικά τόσο από τα καρκινικά κύτταρα όσο και από τα στρωματικά κύτταρα (Balkwill, 2004; Garlanda et al., 2007; Germano et al., 2008). Από αυτές, η χημειοκίνη IL-8/CXCL8 έχει μελετηθεί εκτεταμένα και έχει τεκμηριωθεί η επίδρασή της όσον αφορά την επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της αγγειογένεσης. Τα επίπεδά της παρατηρούνται αυξημένα σε πολλές περιπτώσεις καρκίνου (Aggarwal & Shishodia, 2006).

Πυρηνικός παράγοντας NF-κB

Ο πυρηνικός παράγοντας NF-κB αντιπροσωπεύει μια οικογένεια στενά συσχετιζόμενων και ευρέως διαδεδομένων πρωτεϊνών, οι οποίες αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες και χαρακτηρίζονται από οξειδοαναγωγική ευαισθησία (Aggarwal & Shishodia, 2006; Kwon et al., 2007). Περιλαμβάνει έξι μέλη: τον NF-κB1 (υπομονάδα p50 και το πρόδρομο μόριο της, p105), τον NF-κB2 (υπομονάδα p52 και το πρόδρομο μόριο της, p100), τον RelA (p65), τον RelB (p68), τον c-Rel (p75) και τον v-Rel (Kwon et al., 2007). Οι πρωτεΐνες αυτές προσδένονται σε έναν συγκεκριμένο υποκινητή, σε ένα κοινό μοτίβο αλληλουχίας του DNA- θέσεις κB-, των γονιδίων-στόχων σχηματίζοντας ομοδιμερή ή ετεροδιμερή μεταξύ τους και ρυθμίζουν ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών γεγονότων στις οποίες συμπεριλαμβάνονται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου, η απόπτωση, η διαφοροποίηση και η ογκογένεση (Aggarwal, 2004; Kwon et al., 2007).

Σε κύτταρα που βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας ή σε μη- διεγερμένα κύτταρα, ο NF-κB βρίσκεται δεσμευμένος στις πρωτεΐνες IκB (IκBα, IκBβ, IκBε) στο κυτταρόπλασμα, οι οποίες καλύπτουν την αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού (NLS, nuclear localization sequence). Παράγοντες που ενεργοποιούν τον NF-κB αποτελούν οι ελεύθερες ρίζες, το οξειδωτικό στρες, διάφορα φλεγμονώδη ερεθίσματα, οι κυτταροκίνες, διάφορα καρκινογόνα, ουσίες-προαγωγείς των όγκων, οι ενδοτοξίνες, η υπεριώδης (UV) και η γ-ακτινοβολία και οι ακτίνες-X (Aggarwal & Shishodia, 2006). Όταν τα κύτταρα λαμβάνουν κάποιο από τα προαναφερθέντα ερεθίσματα που ενεργοποιούν τα σηματοδοτικά μονοπάτια του NF-κB, οι πρωτεΐνες IκB -οι οποίες συμβάλλουν στο να παραμένει ο NF-κB σε ανενεργή μορφή στο κυτταρόπλασμα- φωσφορυλιώνονται στις ομάδες σερίνης/θρεονίνης από το σύμπλεγμα κινασών των πρωτεϊνών IκB (IKK) και υπόκεινται σε πρωτεοσωμική διάσπαση μεσολαβούμενη από την ουβικιτίνη (Shishodia & Aggarwal, 2004). Ως αποτέλεσμα, καθίσταται δυνατή η αναγνώριση της αλληλουχίας πυρηνικού εντοπισμού (NLS) και επιτυγχάνεται η μεταφορά του παράγοντα NF-κB στον πυρήνα (Huang et al., 2000; Kwon et al., 2007).

Η ενεργοποίηση του παράγοντα NF-κB επάγει την έκφραση περισσότερων από 200 γονιδίων, τα οποία, όπως έχει φανεί, συσχετίζονται με καταστολή της διαδικασίας της απόπτωσης, κυτταρική μετατροπή, κυτταρικό πολλαπλασιασμό, διείσδυση/εισβολή, μετάσταση, χημειο-αντίσταση και φλεγμονή. Πολλά από αυτά τα ενεργοποιούμενα γονίδια- στόχους διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην εμφάνιση και την εγκατάσταση των

πρώιμων και μεταγενέστερων σταδίων διαφόρων μορφών επιθετικών όγκων, επιδρώντας στην έκφραση πρωτεϊνών όπως της κυκλίνης D1, των πρωτεϊνών καταστολής της απόπτωσης όπως οι Bcl-2 και εκείνων που απαιτούνται για την αγγειογένεση και τη μετάσταση, όπως οι μεταλλοπρωτεϊνάσες μήτρας (MMP) και ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) (Aggarwal & Shishodia, 2006).

Προγενέστερες μελέτες αναφέρουν ότι η ενεργοποίηση του NF-κΒ ενδέχεται να οδηγήσει είτε σε προώθηση είτε σε αναστολή της διαδικασίας της απόπτωσης και η επίδραση αυτή εξαρτάται τόσο από τον τύπο των κυττάρων όσο και από άλλες συνθήκες (Baichwal & Baeuerle, 1997; Bours et al., 2000). Ωστόσο, σε γενικές γραμμές, πιστεύεται ότι η ενεργοποίηση αυτού του παράγοντα προστατεύει τα κύτταρα από αποπτωτικά ερεθίσματα, όπως γίνεται φανερό στην πλειοψηφία των καρκινικών κυτταρικών σειρών, πιθανώς μέσω της επαγωγής της έκφρασης γονιδίων επιβίωσης (Kwon et al., 2007). Αυτή η παρατήρηση συνάδει με το γεγονός ότι τα σηματοδοτικά μονοπάτια του παράγοντα NF-κΒ είναι ενεργοποιημένα σε περιπτώσεις λευχαιμίας, καρκίνου του προστάτη, του μαστού και του παγκρέατος καθώς και με το γεγονός ότι η αναστολή της δράσης του NF-κΒ μπορεί να αυξήσει την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων στη χημειοθεραπευτική φαρμακευτική αγωγή (Bharti & Aggarwal, 2002). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι οι περισσότεροι φλεγμονώδεις παράγοντες εκδηλώνουν τη δράση τους μέσω της ενεργοποίησης του NF-κΒ ενώ, αντίθετα, οι αντιφλεγμονώδεις παράγοντες καταστέλλουν τη δράση του (Shishodia & Aggarwal, 2004). Για τους παραπάνω λόγους, η αναστολή του μονοπατιού μεταγωγής σήματος του παράγοντα NF-κΒ έχει αναδειχθεί ως ένας σημαντικός στόχος διαφόρων χημειοθεραπευτικών αλλά και χημειοπροστατευτικών ενώσεων (Bharti & Aggarwal, 2002; Kwon et al., 2007).

Διάφορα φυτοχημικά όπως η κερκετίνη, οι κατεχίνες, η γενιστεΐνη, η ρεσβερατρόλη, η λιναλοόλη, η καμπεροόλη, η καρνοσόλη, το ουρσολικό οξύ, το λιμονένιο, ο φαινεθυλεστέρας του καφεϊκού οξέος (caffeic acid phenethyl ester, CAPE), τα μονοτερπένια, τα τριτερπένια και γενικά οι πολυφαινόλες και οι διάφορες υποκατηγορίες τους, έχουν αναδειχθεί σε ισχυρούς αναστολείς του παράγοντα NF-κΒ (Yang et al., 2001; Shishodia et al., 2003; Aggarwal & Shishodia, 2006). Οι ενώσεις αυτές είναι σε θέση καταστέλλουν την ενεργοποίηση του NF-κΒ ασκώντας ανασταλτική δράση σε ένα ή περισσότερα βήματα στο σηματοδοτικό του μονοπάτι όπως, για παράδειγμα, στα σήματα που ενεργοποιούν το σηματοδοτικό καταρράκτη του NF-κΒ, στη μετακίνηση του από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και στη σύνδεση των διμερών στην αλληλουχία του DNA ή αλληλεπιδρώντας με

τους βασικούς μεταγραφικούς μηχανισμούς (Aggarwal & Shishodia, 2006). Άλλοι προτεινόμενοι μηχανισμοί αφορούν σε ρύθμιση του ίδιου του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ ή άλλων παραγόντων που ρυθμίζονται από αυτόν όπως η κυκλοοξυγονάση-2 (COX-2), η κυκλίνη D1, διάφορα μόρια προσκόλλησης, οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMP), η επαγόμενη συνθάση του οξειδίου του αζώτου, οι πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-X_L καθώς και ο παράγοντας TNF-α, σε αναστολή της ενεργοποίησης των κινασών των πρωτεϊνών IκΒ και άρα αναστολή της φωσφορυλίωσης και της αποικοδόμησης των πρωτεϊνών IκΒα που εξαρτώνται από τον παράγοντα TNF-α και που απαιτούνται για τη μεταφορά της υπομονάδας p65 του NF-κΒ στον πυρήνα (Yang et al., 2001; Shishodia et al., 2005). Λόγω των επιδράσεων που αναφέρθηκαν παραπάνω, θεωρείται ότι ένας από τους μηχανισμούς μέσω των οποίων τα φυτοχημικά εκδηλώνουν τη χημειοπροστατευτική τους δράση μεσολαβείται από την καταστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού του NF-κΒ.

Ενεργοποιούσα Πρωτεΐνη-1 (activator protein-1, AP-1)

Η ενεργοποιούσα πρωτεΐνη-1 αποτελεί έναν ακόμη οξειδοαναγωγικά ευαίσθητο διμερή μεταγραφικό παράγοντα, ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που συσχετίζονται με την απόπτωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Shirakami et al., 2015). Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί υποδεικνύουν ότι η AP-1 είναι απαραίτητη για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και για την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου (Shaulian & Karin, 2001). Πιο συγκεκριμένα, όπως έχει φανεί, η πρωτεΐνη αυτή προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ασκώντας θετική ρύθμιση στην κυκλίνη D και, συγχρόνως, αρνητική ρύθμιση σε γονίδια που καταστέλλουν τους όγκους, όπως είναι τα p53, p21 και p16 (Shirakami et al., 2015). Παράγοντες που μπορούν να επιδράσουν στην AP-1 αποτελούν οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, διάφοροι αυξητικοί παράγοντες, το οξειδωτικό στρες καθώς και οι παράγοντες προαγωγής των όγκων (Kwon et al., 2007). Οι πρωτεϊνικές κινάσες που ενεργοποιούνται από τα μιτογόνα (Mitogen-Activated Protein Kinases, MAPKs) (ERK, JNK, p38 MAPK) συνιστούν, επίσης, σημαντικούς μεσολαβητές της δραστηριότητας της AP-1 ως απόκριση σε προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες αλλά και σε εξωγενές στρες. Οι κινάσες αυτές φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τα γονίδια στόχους της AP-1 (Chang & Karin, 2001; Kwon et al., 2007). Βιοδραστικά συστατικά που μπορούν να αναστείλουν την ενεργοποίησή της ή τη δράση της AP-1 αποτελούν οι κατεχίνες, η EGCG (Shimizu et al., 2005), η κερκετίνη και η ρεσβερατρόλη (Aggarwal & Shishodia, 2006).

Αναστολή Κυκλοξυγονασών (COX)

Η κυκλοξυγονάση (COX) είναι ένα ρυθμιστικό ένζυμο-κλειδί για τη σύνθεση προσταγλανδινών (PG) και θρομβοξανών A₂ από το αραχιδονικό οξύ (AA). Το ένζυμο είναι γνωστό και ως συνθάση των προσταγλανδινών H και υπάρχει σε δυο διακριτές ισομορφές, τις COX-1 και COX-2, οι οποίες ρυθμίζονται από διαφορετικά γονίδια (*Johnson, 2007; Kwon et al., 2007; Shirakami et al., 2015*). Τα δυο αυτά γονίδια χαρακτηρίζονται από διαφορετική κατανομή και επιτελούν διαφορετικές φυσιολογικές λειτουργίες. Ειδικότερα, το γονίδιο για την ισομορφή COX-1 εκφράζεται σε ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών τύπων και ιστών ενώ η έκφραση του γονιδίου της ισομορφής COX-2 υπόκειται σε ρύθμιση από διάφορους παράγοντες όπως είναι τα μιτογόνα, οι προαγωγείς των όγκων, οι κυτταροκίνες, διάφορες ορμόνες και οι αυξητικοί παράγοντες και έχει προ-φλεγμονώδη ρόλο (*Aggarwal et al., 2003; Kwon et al., 2007; Shirakami et al., 2015*). Αξίζει να αναφερθεί, ακόμη, ότι οι προσταγλανδίνες που απελευθερώνονται από τη δράση της ισομορφής COX-1 είναι απαραίτητες για τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και τη διατήρηση της ακεραιότητας του γαστρικού βλεννογόνου ενώ οι εκείνες που απελευθερώνονται κατά τη δράση της ισομορφής COX-2 συμμετέχουν στη διαδικασία της φλεγμονής (*Johnson, 2007*).

Σε πολλές περιπτώσεις προ-κακοήθων αλλά και κακοήθων συνθηκών έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση του γονιδίου COX-2, όπως για παράδειγμα σε κακοήθειες στο κόλον, τον προστάτη, το μαστό, το ήπαρ, το πάγκρεας, τους πνεύμονες και το δέρμα (*Dai & Mumper, 2010*). Ανάλογα με το ερέθισμα και τον κυτταρικό τύπο, αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες συμπεριλαμβανομένων του NF-κB, της AP-1 και του NF-IL-6 μπορούν να επάγουν τη μεταγραφή των γονιδίων που κωδικοποιούν την ισομορφή COX-2 (*Subbaramaiah & Dannenberg, 2003*). Συνεπώς, τα διατροφικά συστατικά που είναι σε θέση να αναστέλλουν αυτούς τους μεταγραφικούς παράγοντες δύνανται να αποτελούν και αναστολείς της έκφρασης της ισομορφής COX-2. Καθώς η ισομορφή αυτή διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή, η αναστολή της ενδέχεται να μπορεί να συμβάλλει στην αντιμετώπιση διαφόρων μορφών καρκίνου.

Αναστολή Λιποξυγονασών (LOX)

Το αραχιδονικό οξύ (AA) μπορεί να μεταβολιστεί και σε λευκοτριένια (LTs) και υδροξυ-εικοσατετραενοϊκά οξέα (HETEs) με τη δράση ενζύμων που είναι γνωστά ως λιποξυγονάσες (5-LOX) (*Aggarwal & Shishodia, 2006; Kwon et al., 2007*). Υπάρχουν 3 ισομορφές ανάλογα με το είδος των κυττάρων και του ιστού που επηρεάζουν. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι ο αυξημένος μεταβολισμός του αραχιδονικού οξέος

εμπλέκεται στη διαδικασία της φλεγμονής αλλά και της καρκινογένεσης (*Aggarwal & Shishodia, 2006*). Πρώτο βήμα σε αυτόν τον σηματοδοτικό καταρράκτη αποτελεί η ενεργοποίηση των ενζύμων 5-LOX από την ενεργοποιούσα πρωτεΐνη των 5-LOX, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό λευκοτριενίων και HETEs. Τα λευκοτριένια που προκύπτουν επάγουν τη σύνθεση και την ενεργοποίηση άλλων προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών όπως είναι η ιντερλευκίνη-8 (IL-8) και ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (*Kwon et al., 2007*).

Η επίδραση των πολυφαινολών στα ένζυμα αυτά έχει μελετηθεί εκτενώς προκειμένου να διαλευκανθούν οι αντικαρκινικές τους ιδιότητες. Ενδεικτικά αναφέρεται η μελέτη των Hong και συνεργατών του (2001) που αναδεικνύουν την ικανότητα κάποιων πολυφαινολών να αναστέλλουν τη δραστηριότητα των LOX σε όγκους στο κόλον σε ποσοστό έως και 75% (*Hong et al., 2001*).

Επαγωγή Συνθάση του οξειδίου του αζώτου/ νιτρικού οξειδίου (inducible Nitric Oxide Synthase, iNOS)

Η συνθάση του οξειδίου του αζώτου είναι υπεύθυνη για την απελευθέρωση των αέριων ελευθέρων ριζών από οξείδια του αζώτου (NO_x) κατά τη διαδικασία του σχηματισμού της L-κιτρουλλίνης από την L-αργινίνη. Η αυξημένη και παρατεταμένη παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO) που μεσολαβείται από την iNOS έχει συσχετισθεί τόσο με τη φλεγμονή όσο και με την καρκινογένεση (*Aggarwal & Shishodia, 2006*). Επιπλέον, σε ορισμένες μορφές καρκίνου σημειώνεται αυξημένη έκφραση της iNOS, όπως για παράδειγμα, στον ανθρώπινο καρκίνο του παχέος εντέρου (*Rao et al., 1999; Aggarwal & Shishodia, 2006*). Συνεπώς, παράγοντες συμπεριλαμβανομένων των πολυφαινολών (*Lin & Lin, 1997; Soliman & Mazzio, 1998; Tsai et al., 1999*) που παρεμποδίζουν ή αναστέλλουν τη δράση της iNOS είναι πιθανό να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόληψη ή την αντιμετώπιση διαφόρων μορφών καρκίνου.

Παράγοντες ανάπτυξης

Οι αυξητικοί παράγοντες συνιστούν πρωτεΐνες οι οποίες συνδέονται σε υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων με κύριο αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και/ ή της διαφοροποίησης. Ορισμένοι αυξητικοί παράγοντες που έχει αναφερθεί ότι εμπλέκονται στη διαδικασία της καρκινογένεσης αποτελούν ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), ο αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από τα αιμοπετάλια (PDGF), ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (FGFs) και ο αυξητικός

παράγοντας που μιμείται τη δράση της ινσουλίνης (IGF) (Aggarwal & Shishodia, 2006). Τα ισχυρά σήματα για κυτταρικό πολλαπλασιασμό που παράγονται από τους υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων (epidermal growth factor receptor-EGFR, vascular endothelial growth factor receptor- VEGFR, insulin-like growth factor receptor-1- IGF-1) αποτελούν τη βάση για τη δημιουργία όγκων κατά τη διάρκεια της εξέλιξης διαφόρων μορφών καρκίνου (Hahn & Weinberg, 2002). Η μη φυσιολογική κυτταρική σηματοδότηση που μεσολαβείται από τους αυξητικούς παράγοντες οδηγεί σε αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καταστολή των σημάτων απόπτωσης και διείσδυση των όγκων, διαδικασία που συνεισφέρει σημαντικά στη μετάσταση. Επομένως, ουσίες που μπορούν να επηρεάσουν τη δράση αυτών των παραγόντων ενδέχεται να διαθέτουν αντικαρκινική δράση.

Όπως αποδεικνύεται στη βιβλιογραφία, τα σηματοδοτικά μονοπάτια αρκετών αυξητικών παραγόντων μπορούν να ανασταλούν από τη δράση φυτοχημικών. Μεταξύ αυτών των φυτοχημικών συγκαταλέγονται η κουρκουμίνη, η γενιστεΐνη, η ρεσβερατρόλη και οι κατεχίνες (Aggarwal & Shishodia, 2006). Συγκεκριμένα, η κουρκουμίνη και η ρεσβερατρόλη είναι σε θέση να αναστείλουν την έκφραση του EGF σε καρκινικά κύτταρα (Kaneuchi et al., 2003; Shen et al., 2003), ενώ ο EGCG αναστέλλει την παραγωγή του VEGF, ο οποίος εμπλέκται στην αγγειογένεση, αλλά και του PDGF παρεμποδίζοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μιτογένεση και τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων (Weber et al., 2004; Waleh et al., 2005; Xia et al., 2005).

Μεταγωγείς Σήματος και Ενεργοποιητές της Μεταγραφής (Signal Transducer and Activator of Transcription, STAT)

Οι πρωτεΐνες STAT είναι σηματοδοτικά μόρια που έχουν διπλή λειτουργία. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωρισθεί 7 ισομορφές των πρωτεϊνών STAT (STAT1-7) (Aggarwal & Shishodia, 2006). Διαρκής ενεργοποίηση ιδιαίτερα των ισομορφών STAT3 και STAT5 αλλά σε μικρότερο βαθμό, οδηγεί σε αύξηση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, της ανάπτυξης, της επιβίωσης και της διεισδυτικής τους ικανότητας με ταυτόχρονη καταστολή της ανοσίας του οργανισμού εναντίον του όγκου (Aggarwal et al., 2009; Yu et al., 2009). Οι πρωτεΐνες STAT επάγουν την αύξηση της έκφρασης αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως είναι οι Bcl-2 και οι Bcl-X_L, αποτελούν άμεσους ενεργοποιητές του γονιδίου για τον VEGF που ευθύνεται για την αυξημένη ικανότητα αγγειογένεσης και, επιπλέον, μεσολαβούν τη διαδικασία της επαγόμενης από τον όγκο φλεγμονής (Aggarwal & Shishodia, 2006; Yu et al., 2009). Οι παραπάνω επιδράσεις εξηγούν το λόγο που οι δυο

αυτές ισομορφές εμπλέκονται σε διάφορες μορφές συμπαγών όγκων, μυελώματος, λεμφωμάτων και λευχαιμίας (*Bharti et al., 2003*).

Οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν να ενεργοποιηθούν με διάφορους τρόπους: (α) μέσω φωσφορυλίωσης από τις κινάσες Janus (JAK), από τους υποδοχείς των κυτταροκινών, των G-πρωτεϊνών ή αυξητικών παραγόντων (όπως τον EGFR), (β) από τους υποδοχείς του PDGF (γ) από ενδοκυτταρικές τυροσινικές κινάσες που δε φέρουν υποδοχέα, (δ) από την ιντερλευκίνη-6 (IL-6), που προάγει την επιβίωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αλλά και (ε) από ογκογενείς πρωτεΐνες όπως είναι οι Src και οι Ras (*Aggarwal & Shishodia, 2006; Aggarwal et al., 2009*). Επιπλέον, οι STAT3 μπορούν να ενεργοποιηθούν και από καρκινογόνες ουσίες όπως ο καπνός και οι παράγοντες προαγωγής όγκων (*Chan et al., 2004; Arredondo et al., 2006*).

Η επίδραση των φυτοχημικών έχει μελετηθεί και για τη συγκεκριμένη ομάδα πρωτεϊνών. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι βιοδραστικά συστατικά όπως η ρεσβερατρόλη, η κουρκουμίνη και οι κατεχίνες δύνανται να καταστέλλουν την ενεργοποίηση των STAT στα καρκινικά κύτταρα.

1.4.3 Ρύθμιση των ενζύμων φάσης I και II

Ο μεταβολισμός των ξενοβιοτικών, δηλαδή των εξωγενών χημικών ουσιών που εισέρχονται στον οργανισμό, διαχωρίζεται στο μεταβολισμό φάσης I και το μεταβολισμό φάσης II (*Hardman et al., 2001*). Ο μεταβολισμός φάσης I περιλαμβάνει διαδικασίες όπως η υδρόλυση, η οξείδωση, η αναγωγή και η απαμίνωση και καταλήγει σε δομική τροποποίηση μιας ένωσης μέσω λύσης, αλλαγής κάποιας υπάρχουσας λειτουργικής ομάδας ή εισαγωγής κάποιας νέας λειτουργικής ομάδας. Οι διαδικασίες του μεταβολισμού φάσης I επιτελούνται από μια οικογένεια ενζύμων που είναι γνωστά ως ένζυμα του κυτοχρώματος P450. Κατά το μεταβολισμό φάσης II λαμβάνουν χώρα διαδικασίες όπως η γλυκουρονιδίωση, η προσθήκηθεικής ομάδας, η ακετυλίωση και η μεθυλίωση με σκοπό την αύξηση της πολικότητας και της διαλυτότητας της εξωγενούς ουσίας και, συνεπώς, τη διευκόλυνση της εκκαθάρισής της ή τη μείωση της βιολογικής της δραστηριότητας (*Issa et al., 2006; Wang et al., 2011*). Τα ένζυμα που μεσολαβούν τη φάση II είναι η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST), η οξειδοαναγωγή της κινόνης του NAD(P)H (NQO) και η UDP-γλυκουρονυλο-τρανσφεράση (*Wang et al., 2011*).

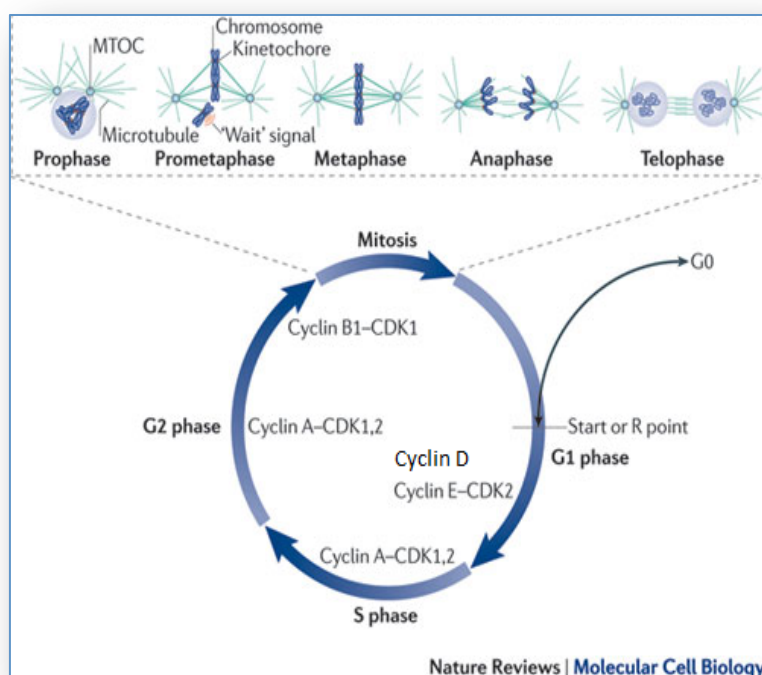
Τα διάφορα χημικά καρκινογόνα ενδέχεται να ενεργοποιούνται μέσω του μεταβολισμού φάσης I ή να αποτοξινώνονται μέσω του μεταβολισμού φάσης II (*Issa et al., 2006*). Βιβλιογραφικά αναφέρεται ότι πολλά φυτοχημικά είναι σε θέση να εκδηλώνουν τη

χημειοπροστατευτική τους δράση μέσω αναστολής των ενζύμων φάσης I ή μέσω επαγωγής των ενζύμων φάσης II (Block & Gyllenhaal, 2002; Wang et al., 2011).

1.4.4 Αναστολή της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου (Cell cycle arrest)

Ο κυτταρικός κύκλος αποτελεί την περιγραφή των σταδίων που πραγματοποιούνται κατά τη διαδικασία της διαίρεσης των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, ως κυτταρικός κύκλος ορίζεται το χρονικό διάστημα μεταξύ του τέλους μιας κυτταρικής διαίρεσης μέχρι το τέλος της επόμενης διαίρεσης. Η «απόφαση» ενός φυσιολογικού κυττάρου για το αν θα πραγματοποιηθεί αντιγραφή του DNA του και θα διπλασιαστεί επηρεάζεται από ποικίλα εξωκυττάρια σήματα (Blagosklonny & Pardee, 2002).

Πρώτο στάδιο του κυτταρικού κύκλου αποτελεί η φάση G1 (gap 1, πρώτο χάσμα), η οποία προηγείται της αντιγραφής του DNA. Κατά τη διάρκεια της φάσης αυτής γίνεται ερμηνεία μιας πληθώρας σημάτων που επηρεάζουν τόσο την κυτταρική διαίρεση όσο και την κατάληξη του κυττάρου. Λάθη που μπορούν να συμβούν σε αυτό το στάδιο είναι πολύ πιθανό να οδηγήσουν σε καρκινογένεση



Εικόνα 1.9: Ο κυτταρικός κύκλος

λόγω των πολύπλοκων και στενά συνδεδεμένων σηματοδοτικών μηχανισμών που είναι υπεύθυνοι για το συντονισμό της κυτταρικής ανάπτυξης, του πολλαπλασιασμού, της διαχείρισης καταστάσεων στρες και της επιβίωσης του κυττάρου (Massague, 2004). Ακολουθεί η φάση S (DNA synthesis) κατά τη διάρκεια της οποίας το DNA αντιγράφει με εξαιρετική ακρίβεια τον εαυτό του, δημιουργώντας ένα πανομοιότυπο αντίγραφο του (θυγατρικό DNA). Αφού ολοκληρωθεί η αντιγραφή, το κύτταρο εισέρχεται στη φάση G2 (gap 2, δεύτερο χάσμα) όπου και προετοιμάζεται για την είσοδο στη φάση της μίτωσης (M, mitosis). Σε αυτό το στάδιο, το διπλασιασμένο DNA διαχωρίζεται με ακρίβεια σε δυο ίσα μέρη συμπυκνώνεται σχηματίζοντας χρωμοσώματα έτσι ώστε καθένα από τα δυο

θυγατρικά κύτταρα να φέρει ένα πλήρες αντίγραφο του γενετικού υλικού του μητρικού κυττάρου (*Blagosklonny & Pardee, 2002*).

Πλην των τεσσάρων φάσεων που προαναφέρθηκαν, υπάρχει και η φάση G0 (φάση ηρεμίας). Το διαιρούμενο κύτταρο που προέκυψε από τη μίτωση, μπορεί αντί της εισόδου στη φάση G1 να εισέλθει σε φάση ηρεμίας ανάλογα με τις συνθήκες και τις ανάγκες του οργάνου, ιστού ή οργανισμού. Η επιλογή εισόδου του κυττάρου στη φάση G0 αντί της G1 καθορίζεται από ποικίλα εξωτερικά ερεθίσματα (επάρκεια ή έλλειψη εξωγενών μιτογόνων, αυξητικών ή άλλων παραγόντων). Ανά πάσα στιγμή και υπό την επίδραση των παραπάνω παραγόντων η φάση G0 μπορεί να μετατραπεί σε φάση G1. Το καθοριστικό σημείο μετάπτωσης από τη φάση ηρεμίας G0 στη φάση G1 ονομάζεται περιοριστικό σημείο επαναλειτουργίας (R, restriction point). Μετά τη δίοδο του κυττάρου από το σημείο R, το κύτταρο δεν υπακούει πλέον σε εξωτερικά ερεθίσματα και η πορεία του διαμέσου του κυτταρικού κύκλου μέχρι και την ολοκλήρωση της μίτωσης είναι προδιαγεγραμμένη (*Blagosklonny & Pardee, 2002*).

Σε καταστάσεις καρκίνου, η διακοπή του κυτταρικού κύκλου συμβαίνει ως απόκριση στο κυτταρικό στρες που προκαλείται από τη διαρκή κυτταρική διαίρεση μέσω ενεργοποίησης μονοπατιών μεταγωγής σήματος, τα οποία δρουν ως καταστολείς των όγκων (όπως το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 και ο καταστολέας για το ρετινοβλάστωμα- RB suppressor) και συνήθως αναφέρονται ως σημεία ελέγχου (checkpoints), αλλά και μέσω των κυκλινών (cyclins), των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDKs) και των αναστολέων των κινασών αυτών (CDKIs) που αποτελούν τα ρυθμιστικά μόρια για την εξέλιξη του κύκλου (*Hartwell & Weinert, 1989; Singh et al., 2002; Canavese et al., 2012; Teiten et al., 2013*). Τα σημεία ελέγχου ενεργοποιούνται είτε στη φάση G1/S με σκοπό να αποτρέψουν την αντιγραφή του τμήματος του DNA που έχει υποστεί βλάβη είτε στη φάση G2/M προκειμένου να αποφευχθεί ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων που φέρουν τη βλάβη κατά τη διάρκεια της μίτωσης (*Neergheen et al., 2010*). Τα σημεία αυτά διασφαλίζουν την ολοκλήρωση γεγονότων που συμβαίνουν σε συγκεκριμένα στάδια του κυτταρικού κύκλου και βοηθούν στη διατήρηση της γενετικής ακεραιότητας (*Hartwell & Weinert, 1989*).

Ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου κατά τη διάρκεια της μετάβασης από τη φάση G1 στη φάση S αλλά και κατά τη μετάβαση από τη φάση G2 στη φάση M είναι καθοριστικής σημασίας καθώς μόνο τότε είναι δυνατή η διασφάλιση της ακρίβειας κατά την κυτταρική διαίρεση. Η εξέλιξη της φάσης G1 ρυθμίζεται από τις κυκλινές τύπου D και το σύμπλοκο

των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών CDK4 και CDK6. Το σύμπλοκο CDK2-κυκλίνης E είναι υπεύθυνο για τη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S ενώ για την εξέλιξη της φάσης S απαιτείται το σύμπλοκο CDK2-κυκλίνης A. Τέλος, για τη μετάβαση από τη φάση G2 στην M είναι απαραίτητη προϋπόθεση η παρουσία του συμπλόκου CDK1 (ή cdc2)- κυκλίνης B (Singh et al., 2002). Η διαδικασία της καρκινογένεσης συνήθως επιδρά στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου μέσω της φάσης S επάγοντας αλλαγές στην έκφραση και/ή στην ενεργοποίηση ρυθμιστικών παραγόντων του κύκλου, γι αυτό και αποτελεί έναν πιθανό στόχο για χημειοπροστασία (Neergheen et al., 2010).

Μελέτες αναφέρουν ότι ένας μεγάλος αριθμός φυτοχημικών είναι σε θέση να επάγουν αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων παρεμβαίνοντας στην απορρυθμισμένη εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου μέσω τροποποίησης της έκφρασης και/ή της δραστηριότητας βασικών πρωτεϊνών, όπως η κυκλίνη D1, η κυκλίνη B1, η κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση cdk2, η cdc2, το γονίδιο p53, p21 και p27^{kip1} (Neergheen et al., 2010; Wang et al., 2011). Η ρεσβερατρόλη, για παράδειγμα, εκδηλώνει την αντικαρκινική της δράση αναστέλλοντας την έκφραση ρυθμιστικών παραγόντων κατά τη μετάβαση G1/S του κυτταρικού κύκλου και, πιο συγκεκριμένα, της κυκλίνης D1, της CDK4 και της κυκλίνης E σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του μαστού, αναστέλλοντας την έκφραση των ρυθμιστών cdc2 και της κυκλίνης B1 της φάσης G2/M και επάγοντας σταδιακή μείωση της δραστηριότητας κινάσης των συμπλεγμάτων κυκλίνης D1/CDK4 και κυκλίνης B1/cdc2 (Pozo-Guisado et al., 2002). Η κερκετίνη, από την άλλη πλευρά, δρα μέσω αποκλεισμού της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου στη φάση G0/G1 σύμφωνα με την αναστολή της Cdk ενώ η μυρισετίνη αναστέλλει την Cdk2 (Cragg & Newman, 2005). Άλλα βιοδραστικά συστατικά που είναι σε θέση να τροποποιούν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου αποτελούν τα διτερπένια καρνοσόλη και καρνοσικό οξύ επάγοντας διακοπή του κύκλου στη φάση G2/M αυξάνοντας την έκφραση της κυκλίνης B1 ή μειώνοντας τα επίπεδα της κυκλίνης A (Visanji et al., 2006; Teiten et al., 2013).

1.4.5 Επαγωγή των διαδικασιών Διαφοροποίησης και Απόπτωσης

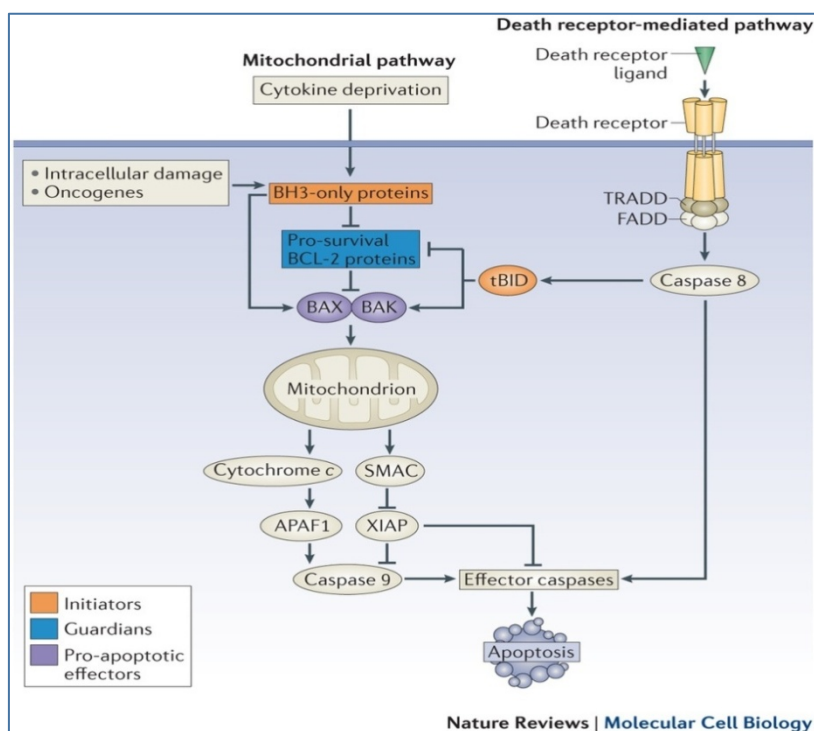
Ο κυτταρικός θάνατος στους πολυκύτταρους οργανισμούς συμβαίνει με τρεις διακριτούς μηχανισμούς, τη νέκρωση, την αυτοφαγία και την απόπτωση (Lockshin & Zakeri, 2004; Kanadaswami et al., 2005). Ο όρος απόπτωση αναφέρεται στη διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε φυσιολογικές διαδικασίες όπως η διαφοροποίηση, η ανάπτυξη, η διατήρηση της ιστικής ομοιόστασης και η ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος (Kanadaswami et al., 2005;

Pan et al., 2008). Η διαδικασία αυτή συμβάλλει στο να επιτευχθεί μια φυσιολογική ισορροπία μεταξύ κυτταρικού θανάτου και κυτταρικής ανανέωσης μέσω της καταστροφής της περίσσειας κυττάρων, των κυττάρων που έχουν υποστεί καταστροφή και των μη φυσιολογικών κυττάρων (*Aggarwal & Shishodia, 2006*). Πρόκειται για το αποτέλεσμα πολύπλοκων ενδοκυτταρικών μονοπατιών μεταγωγής σήματος, στα οποία συμπεριλαμβάνονται μέλη της οικογένειας των κασπασών-πρωτεασών κυστεΐνης, που επιφέρουν κυτταρικό θάνατο (*Pan et al., 2008*). Αυτή η μορφή κυτταρικού θανάτου μεσολαβείται και ρυθμίζεται από συγκεκριμένα γονίδια, με αποτέλεσμα να αποτελεί μια διαδικασία ευαίσθητη σε μεταλλάξεις (*Kanadaswami et al., 2005*).

Το πρόγραμμα της απόπτωσης φέρει συγκεκριμένα μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά, τα οποία συμπεριλαμβάνουν τη διόγκωση της μεμβράνης και την απώλεια της ασυμμετρίας της, τη συμπύκνωση του κυτταροπλάσματος, του πυρήνα και της χρωματίνης που οδηγούν σε κυτταρική συρρίκνωση καθώς και τον κατακερματισμό/θραυσματοποίηση του DNA λόγω ενδοπυρηνικής διάσπασής του (*Pan et al., 2008*). Τα μακροφάγα αναγνωρίζουν γρήγορα τα αποπτωτικά κύτταρα προτού αυτά υποστούν λύση και τα απομακρύνουν χωρίς την επαγωγή φλεγμονώδους αντίδρασης (*Dai & Mumper, 2010*). Πρόκειται, δηλαδή, για έναν προστατευτικό μηχανισμό ενάντια στην καρκινογένεση καθώς με αυτόν τον τρόπο τα γενετικά κατεστραμμένα κύτταρα-κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη και καρκινικά κύτταρα- απομακρύνονται από το επιθήλιο προτού να υποστούν κλωνική επέκταση αποτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την ανάπτυξη τους και τη δημιουργία όγκων (*Kanadaswami et al., 2005; Araújo et al., 2011*). Ακόμη, είναι γνωστό ότι ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων είναι η ικανότητά τους να διαφεύγουν του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (*Teiten et al., 2013*). Για το λόγο αυτό, άλλωστε, οι βλάβες ή η αντίσταση στη διαδικασία της απόπτωσης συνιστούν ένα ακόμη ορόσημο του καρκίνου (*Johnson, 2002*).

Τα κύρια μονοπάτια τα οποία συσχετίζονται με την έναρξη της διαδικασίας της απόπτωσης (Εικόνα 1.10) είναι τα ακόλουθα: (1) το εξωγενές μονοπάτι, το οποίο μεσολαβείται από τους υποδοχείς κυτταρικού θανάτου (DR, death receptors) 3 έως 6, CD95/Fas/Apo1 και τους υποδοχείς 1 και 2 του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF) και ενεργοποιείται από την κασπάση-8 (*Young et al., 2005; Pan et al., 2008; Reuter et al., 2008*) και (2) το ενδογενές μονοπάτι που μεσολαβείται από τα μιτοχόνδρια και ενεργοποιείται από την κασπάση-9 (*Gossiau & Chen, 2004; Pan et al., 2008*), στο οποίο η διάδοση του αποπτωτικού σήματος ρυθμίζεται από πρωτεΐνες όπως τα μέλη της

οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2, όπως οι Bcl-2, Bcl-x L και Bcl-w, οι οποίες ασκούν αντι-αποπτωτικές επιδράσεις και οι Bid, Bad, Bak, Bax και Bim, οι οποίες ασκούν προαποπτωτική επίδραση (Yanez *et al.*, 2004; Young *et al.*, 2005; Reuter *et al.*, 2008). Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν, την παρουσία ενός τρίτου μονοπατιού που αφορά στο υποκυτταρικό διαμέρισμα του ενδοπλασματικού δικτύου (ER), το οποίο περιέχει



Εικόνα 1.10: Σχηματική παρουσίαση των δυο κυριότερων μονοπατιών που μεσολαβούν την αποπτωτική διαδικασία, του εξωγενούς (δεξιά) και του ενδογενούς (αριστερά) (Rowe & Chuang, 2004)

κασπάσες που συμμετέχουν, επίσης, στη διαδικασία της επαγόμενης από το στρες απόπτωσης (Rao *et al.*, 2004; Pan *et al.*, 2008; Reuter *et al.*, 2008).

Το πρώτο στάδιο στην ενεργοποίηση της απόπτωσης περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση των κυτταρικών επιφανειακών υποδοχέων, όπως είναι οι υποδοχείς Fas, DR3, DR4, DR5 και οι υποδοχείς του TNF, με τους αντίστοιχους προσδέτες τους (Pan *et al.*, 2008). Η συμμετοχή του μιτοχονδριακού μονοπατιού γίνεται σε δεύτερο στάδιο, τις περισσότερες φορές ως απόκριση σε κυτταρικό στρες, απώλεια παραγόντων επιβίωσης και άλλων ερεθισμάτων ανάπτυξης (Green & Evan, 2002; Ricci *et al.*, 2004). Το μονοπάτι αυτό, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, ρυθμίζεται από τις πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2, οι οποίες επιφέρουν αλλαγές στη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων και οι οποίες μπορεί να εκδηλώνουν αντι-αποπτωτική ή προ-αποπτωτική δράση (Rowe & Chuang, 2004; García-Sáez *et al.*, 2010; Shamas-Din *et al.*, 2013).

Η αναλογία των προ-και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών υπόκειται σε αυστηρή ρύθμιση από το γονίδιο p53 (Rowe & Chuang, 2004). Η δημιουργία πόρων στη μεμβράνη επιτρέπει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και άλλων αποπτωτικών παραγόντων από τον ενδομεμβρανή μιτοχονδριακό χώρο στο κυτταρόπλασμα. Το κυτόχρωμα c προσδένεται, ακολούθως, στον παράγοντα Apaf-1 (*apoptosis-protease-activating factor-1*) οδηγώντας

στην ενεργοποίηση κασπασών, όπως η κασπάση-9, και επάγοντας τελικά τον κυτταρικό θάνατο. Οι κασπάσες 8 και 9, αποτελούν εκκινητές (*initiator caspases*) ενός καταρράκτη άλλων κασπασών (*effector caspases*, κασπάσες-τελεστές), όπως η κασπάση-3, οι οποίες στη συνέχεια διασπούν πλήθος κυτταρικών πρωτεϊνών, όπως δομικές και πυρηνικές πρωτεΐνες, πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού αλλά και σηματοδοτικά μόρια, οι οποίες οδηγούν τελικά τα κύτταρα σε απόπτωση (*Pan et al., 2008*). Η απορρύθμιση της συγκεκριμένης λειτουργίας των μιτοχονδρίων διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο τόσο στη διαδικασία της ογκογένεσης όσο και στην κυτταρική απόκριση σε αντικαρκινικές θεραπείες (*Juin et al., 2013; Czabotar et al., 2014*).

Όσον αφορά την επίδραση των φυτοχημικών στη διαδικασία της απόπτωσης, υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι αυτά τα βιοδραστικά συστατικά μπορούν να επηρεάσουν τα μονοπάτια που περιγράφηκαν παραπάνω. Πιο συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι πολλά βιοδραστικά συστατικά μπορούν να επάγουν την απόπτωση μέσω του ενδογενούς μονοπατιού όπου το ερέθισμα για κυτταρικό θάνατο ενεργοποιεί ένα σηματοδοτικό καταρράκτη επιδρώντας στη διαπερατότητα της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και επιτρέπει την απελευθέρωση παραγόντων, όπως το κυτόχρωμα *c*, οι ενδονουκλεάσες *G*, δευτερογενείς μιτοχονδριακοί ενεργοποιητές του παράγοντα που επάγει την απόπτωση (*AIF*, apoptosis-inducing factor) και της κασπάσης *Smac* (*Zamzami & Kroemer, 2001*).

Για παράδειγμα, το λυκοπένιο μπορεί να οδηγήσει τα κύτταρα σε απόπτωση μέσω επαγωγής της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος *c* από τα μιτοχόνδρια σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του προστάτη ενώ η λουτεολίνη μπορεί να προκαλέσει εκπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα, να επάγει απελευθέρωση του κυτοχρώματος *c* και ενεργοποίηση του καταρράκτη κασπασών οδηγώντας τελικά στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων (*Cheng et al., 2005; Pan et al., 2005*). Επιπλέον, η επαγόμενη από τη ρεσβερατρόλη απόπτωση συνοδεύεται από αυξημένη δραστηριότητα των κασπασών, διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση *G1* ή αναστολή της εξέλιξης του από τη φάση *S* στη φάση *G2*, μειωμένα επίπεδα της κυκλίνης *D1* και της κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης *Cdk-4* όπως, επίσης, και μειωμένα επίπεδα των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών *Bcl-2* και *Bcl-X_L* και αυξημένα επίπεδα των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών *Bax* (*Aggarwal et al., 2004*). Η απιγενίνη και η καρνοσόλη συγκαταλέγονται, επίσης, στα συστατικά που μπορούν να επάγουν απόπτωση (*Lu et al., 2011; Lopez-Jimenez et al., 2013*). Καθώς τα περισσότερα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσονται ταχύτατα, οι πιο

αποτελεσματικοί παράγοντες που επάγουν την απόπτωση είναι εκείνοι που επιδρούν και διακόπτουν τα μιτογόνα κυτταρικά σήματα (*Pan et al., 2008*).

Τέλος, όσον αφορά στη διαφοροποίηση είναι γνωστό ότι ο νεοπλασματικός μετασχηματισμός οδηγεί σε αδυναμία των κυττάρων να διαφοροποιηθούν. Τα φυτοχημικά, όπως, για παράδειγμα, η ρεσβερατρόλη, μπορούν να επάγουν τη διαφοροποίηση με ταυτόχρονη αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων (*Singh et al., 2002*).

1.4.6 Αναστολή της έκφρασης και της λειτουργικής ενεργοποίησης ογκογονιδίων

Τα πρωτο-ογκογονίδια αποτελούν φυσιολογικά γονίδια τα οποία είναι υπεύθυνα για τον έλεγχο της ανάπτυξης, της εξέλιξης και της διαφοροποίησης των κυττάρων. Η δημιουργία μετάλλαξης επιφέρει βλάβες στα μακρομόρια και διακοπή σημαντικών μεταβολικών μονοπατιών μέσω της επαγωγής γενετικών αλλαγών ή μέσω επιγενετικών διαδικασιών, όπως είναι η μεθυλίωση του DNA, οι τροποποιήσεις των ιστονών και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών (*Ohshima et al., 2005; Neergheen et al., 2010*). Τότε αυτά ενδέχεται να μετατραπούν σε ογκογονίδια τα οποία μπορούν να οδηγήσουν σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων, ανάπτυξη όγκων και αγγειογένεση. Παράλληλα, επάγεται η έκφραση γονιδίων που μεσολαβούν τη φλεγμονή αλλά και προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως οι IL-1, IL-6, IL-11 και της χημειοκίνης IL-8 που συμβάλλουν στην περαιτέρω ανάπτυξη του όγκου (*Sparmann et al., 2004; Schetter et al., 2010*). Η ενεργοποίηση και άλλων ογκογονιδίων καθώς και η καταστολή ογκοκατασταλτικών γονιδίων δημιουργούν ένα μικροπεριβάλλον ιδανικό για την εγκατάσταση όγκου στον οργανισμό (*Montes et al., 2008*).

Γι αυτό το λόγο, παράγοντες που έχουν τη δυνατότητα να αναστέλλουν τη δράση των ογκογονιδίων, θα μπορούσαν να παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση του καρκίνου. Στα συστατικά που έχουν μελετηθεί συγκαταλέγονται η απιγενίνη, η EGCG, η ρεσβερατρόλη καθώς και η κερκετίνη (*Link et al., 2011*). Έχει φανεί ότι είναι σε θέση να επιδρούν στους επιγενετικούς μηχανισμούς, όπως για παράδειγμα, στην ακετυλίωση των ιστονών, στην αναστολή της υπερ-μεθυλίωσης του DNA ή στην αναστολή της αποσιώπησης γονιδίων-όταν πρόκειται για ογκοκατασταλτικά γονίδια-, ωστόσο αυτό το πεδίο, χρειάζεται ακόμη αρκετή έρευνα (*Lee et al., 2005; Pandey et al., 2012*).

1.4.7 Επαγωγή της έκφρασης γονιδίων καταστολής όγκων

Τα γονίδια καταστολής όγκων (ογκοκατασταλτικά γονίδια) επιτελούν προστατευτικές λειτουργίες περιορίζοντας την ανάπτυξη των όγκων και ρυθμίζοντας ποικίλες κυτταρικές δραστηριότητες (Sherr, 2004). Στις δραστηριότητες αυτές συμπεριλαμβάνονται η επιδιόρθωση βλαβών των DNA, η διακοπή του κυτταρικού κύκλου, η κυτταρική διαφοροποίηση, η μετανάστευση των κυττάρων, η απόπτωση καθώς και η σηματοδότηση από μιτογόνα (Vurusaner et al., 2012). Όταν τα γονίδια αυτά υπόκεινται σε αλλαγές, τα κύτταρα αναπτύσσονται ανεξέλεγκτα, κατάσταση που ευνοεί τη δημιουργία και την εγκατάσταση όγκων.

Σε πολλές περιπτώσεις καρκίνου στον άνθρωπο, το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 είναι εκείνο που φέρει τις μεταλλάξεις (Liu & Chen, 2006). Το γονίδιο αυτό δρα ως μεταγραφικός παράγοντας ενεργοποιώντας ή καταστέλλοντας ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων που εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, την κυτταρική γήρανση, την απόκριση στο κυτταρικό στρες, την επιδιόρθωση του DNA και την απόπτωση (Mirza et al., 2003). Σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες, παρατηρείται ενεργοποίηση του p53 οπότε και διαδραματίζει ρόλο αντιοξειδωτικού παράγοντα επάγοντας την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν ενδογενή αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και η μιτοχονδριακή υπεροξειδική δισμουτάση (MnSOD) συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στο αντιοξειδωτικό σύστημα άμυνας (Hussain et al., 2004). Η παρουσία μετάλλαξης στο γονίδιο αυτό συνεπάγεται απώλεια της ικανότητας αποτελεσματικής δέσμευσης του στο DNA και αδυναμία της πρωτεΐνης p21, που εξαρτάται από αυτό, να ρυθμίσει τη διαδικασία της κυτταρικής διαίρεσης και να οδηγήσει σε απόπτωση τα κύτταρα που φέρουν κατεστραμμένο DNA. Έτσι, τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα αυξάνοντας την πιθανότητα σχηματισμού όγκων (Aggarwal & Shishodia, 2006).

Όπως γίνεται αντιληπτό, παράγοντες που μπορούν να επιδράσουν και να ενεργοποιήσουν το συγκεκριμένο γονίδιο ή άλλα ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι πιθανό να μπορούν να συμβάλλουν στην πρόληψη της εμφάνισης και της εξάπλωσης διαφόρων μορφών καρκίνου. Από τα φυτοχημικά, η ρεσβερατρόλη, η EGCG, η κερκετίνη και η κουρκουμίνη έχουν φανεί ότι είναι σε θέση να ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου p53. Τα συστατικά αυτά μπορούν να ενεργοποιούν το γονίδιο p53 και να οδηγούν μέσω του σηματοδοτικού του μονοπατιού (p21, Bax, Bcl-X_L, p27) τα καρκινικά κύτταρα σε

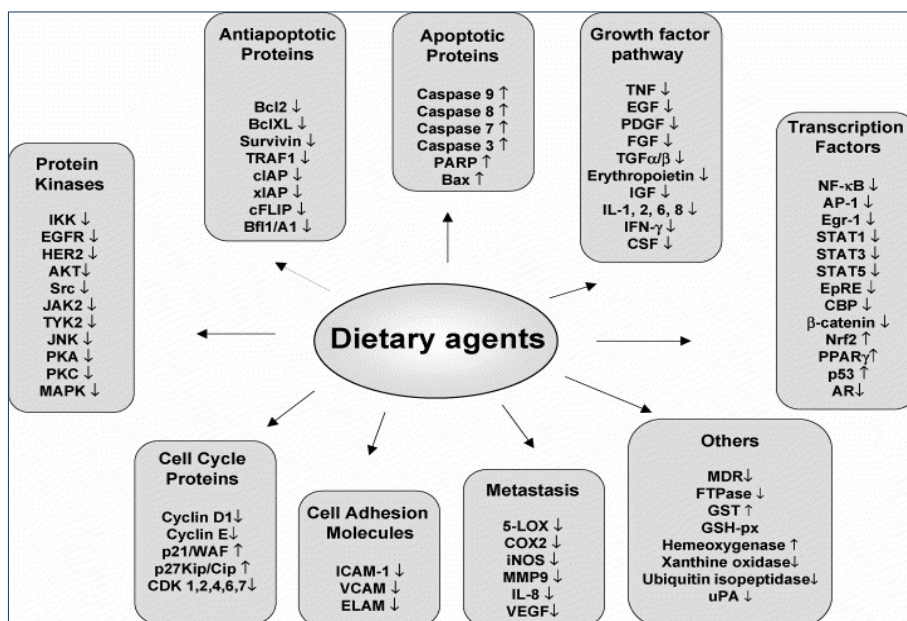
απόπτωση (Kuo & Lin, 2003; Choudhuri et al., 2005; Vanamala et al., 2010; Xavier et al., 2011).

1.4.8 Αναστολή της αγγειογένεσης και της μετάστασης μέσω τροποποίησης των μονοπατιών μεταγωγής σήματος/κυτταρικής σηματοδότησης

Με τον όρο καρκινική αγγειογένεση περιγράφεται ο πολλαπλασιασμός ενός δικτύου αιμοφόρων αγγείων που διεισδύουν στις καρκινικές νεοπλασίες παρέχοντας θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο και απομακρύνοντας άχρηστα παραπροϊόντα από το περιβάλλον του όγκου. Πιο συγκεκριμένα, η διαδικασία αυτή ξεκινάει από τα καρκινικά κύτταρα, τα οποία απελευθερώνουν μόρια-σήματα στους περιβάλλοντες υγιείς ιστούς του οργανισμού, ενεργοποιώντας συγκεκριμένα γονίδια που με τη σειρά τους παράγουν πρωτεΐνες (IL-8, TNF, VEGF, EGF) οι οποίες ενισχύουν την ανάπτυξη νέων αγγείων συμβάλλοντας τα μέγιστα στην ανάπτυξη του όγκου και τη μετάσταση (Aggarwal & Shishodia, 2006; Neergheen et al., 2010).

Στους διατροφικούς παράγοντες που επιδρούν ανασταλτικά στη διαδικασία της αγγειογένεσης και της μετάστασης συμπεριλαμβάνονται η απιγενίνη, η γενιστεΐνη, η λουτεολίνη, το καφεϊκό οξύ, το χλωρογενικό οξύ, οι ταννίνες, οι κατεχίνες, η καρνοσόλη, οι ανθοκυανίνες, η ρεσβερατρόλη και η κουρκουμίνη, οι οποίες έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικές τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* πειράματα σε ένα μεγάλο εύρος κυτταρικών καρκινικών σειρών (Huang et al., 2005; Tanimura et al., 2005; Ogasawara et al., 2007; Hu et al., 2008; Mojzis et al., 2008).

Οι μοριακοί στόχοι των διαφόρων διατροφικών παραγόντων παρουσιάζονται συνοπτικά στην Εικόνα 1.11:



Εικόνα 1.11: Συνοπτική παρουσίαση των μοριακών στόχων των διαιτητικών παραγόντων που εκδηλώνουν χημειοπροστατευτική δράση.

1.5 Μελισσόχορτο (*Melissa officinalis* L., *Lemon Balm*)



Εικόνα 7: Μελισσόχορτο

Το Μελισσόχορτο ανήκει στην οικογένεια των Lamiaceae και στο γένος *Mentha* και συγκαταλέγεται στα αρωματικά- φαρμακευτικά φυτά. Πρόκειται για μια πολυετή πόα, η οποία αποτελεί ιθαγενές φυτό της κεντρικής και νότιας Ευρώπης (ιδιαίτερα της περιοχής της Μεσογείου) αλλά και της περιοχής της Μικράς Ασίας (Zargari, 1990). Ωστόσο, πλέον καλλιεργείται ευρύτατα σε όλον τον κόσμο τόσο λόγω της διαδεδομένης χρήσης του στις διάφορες μαγειρικές παρασκευές όσο και των φαρμακευτικών ιδιοτήτων που του έχουν αποδοθεί σύμφωνα με την παραδοσιακή ιατρική. Ακόμη, χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων προκειμένου να δώσει τη χαρακτηριστική γεύση και το άρωμα του σε διάφορα προϊόντα (López et al., 2009).

Οι μελέτες που έχουν διεξαχθεί για την ανάλυση της χημικής σύστασης του μελισσόχορτου αποδεικνύουν την παρουσία πληθώρας βιοδραστικών συστατικών. Πιο συγκεκριμένα, το μελισσόχορτο περιέχει υδροξυ-κινναμωμικά οξέα (ροσμαρινικό οξύ (>6%), p- κουμαρικό οξύ, καφεϊκό οξύ, χλωρογενικό οξύ, φερουλικό οξύ) και έως 0.37% αιθέριο έλαιο το οποίο συνίσταται από μονοτερπένια σε ποσοστό μεγαλύτερο από 40% και σεσκιτερπένια σε ποσοστό μεγαλύτερο από 35% (WHO, 2004; ESCOP, 2003). Μεταξύ των πιο σημαντικών τερπενοειδών που ανιχνεύονται είναι η κιτράλη, η κιτρονελλάλη, η γερανιόλη, η λιναλοόλη και το β- καριοφυλλένιο ενώ εντοπίζονται σε αξιόλογα ποσοστά και άλλες ουσίες όπως τα φλαβονοειδή κερκετίνη, απιγενίνη, καμπεφρόλη, γλυκοζίτες λουτεολίνης, ταννίνες και όξινα τριτερπένια (τα τερπενικά οξέα, ουρσολικό και ολεανολικό οξύ) (Arceusz & Wesolowski, 2013). Έχει αναφερθεί, ακόμη, ότι περιέχει και ασκορβικό οξύ σε αρκετά υψηλή συγκέντρωση (Capecka et al., 2005).

Όσον αφορά τις δράσεις του στην υγεία, πιστεύεται ότι οι περισσότερες από αυτές αποδίδονται στην παρουσία των συστατικών του που αναφέρθηκαν παραπάνω (Encalada et al., 2011). Υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι το αιθέριο έλαιο του βοτάνου είναι κυρίως υπεύθυνο για την εκδήλωση βιολογικής δραστηριότητας όπως σπασμολυτική, αντιμικροβιακή, αντικαρκινική και αντιοξειδωτική (de Sousa et al., 2004; Pereira et al., 2009). Ωστόσο, και το φαινολικό περιεχόμενο του βοτάνου και ειδικότερα η υψηλή περιεκτικότητά του σε υδροξυ-κινναμωμικά οξέα όπως το ροσμαρινικό οξύ, μεσολαβεί σε σημαντικό βαθμό αυτές τις δράσεις του (Sadraei et al., 2003; Fecka & Turek, 2007).

Στον τομέα της παραδοσιακής ιατρικής, η κατανάλωση μελισσόχορτου με τη μορφή ροφήματος/ αφεψήματος, έχει συσχετισθεί με ευεργετική επίδραση όσον αφορά στην αντιμετώπιση του κοινού κρυολογήματος, του πονοκεφάλου, του ιλίγγου, της αναιμίας, της βρογχίτιδας, του άσθματος, των ρευματισμών, της φλεγμονής, της καρδιακής ανεπάρκειας, διαφόρων μορφών έλκους και των υψηλών επιπέδων λιπιδίων (*Bolkent et al. 2005; Dastmalchi et al., 2008*). Επιπλέον, έχει φανεί ότι το ρόφημα από φύλλα μελισσόχορτου μπορεί να συμβάλλει θετικά στην αντιμετώπιση της αϋπνίας, της αγχώδους διαταραχής, της κατάθλιψης και διάφορων μορφών ψύχωσης εκδηλώνοντας ηρεμιστική δράση μέσω αναστολής της τρανσαμινάσης του γ- αμινοβουτυρικού οξέος (GABA) (*Carnat et al., 1998; Kennedy et al., 2003; Awad et al., 2009*) ενώ στη βιβλιογραφία αναφέρεται και πιθανή προστατευτική δράση ενάντια στη νόσο του Alzheimer (*Akondzadeh et al., 2003; Santos-Neto et al., 2006*). Η ευεργετική του δράση σε διάφορες πεπτικές διαταραχές (δυσπεψία, ναυτία, μετεωρισμός), επίσης, υποστηρίζεται από σχετικές μελέτες (*Shemann et al., 2006; Simmen et al., 2006*).

Παρόλο που τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις προαναφερθείσες μελέτες υποδεικνύουν το μεγάλο εύρος δραστηριότητας του μελισσόχορτου, κρίνεται απαραίτητο να διεξαχθεί περαιτέρω έρευνα προκειμένου να ελεγχθούν και να επιβεβαιωθούν οι δράσεις του αυτές στην υγεία.

Σκοπός

Οι Μεσογειακές χώρες, συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας, χαρακτηρίζονται από πλούσια χλωρίδα στην οποία συγκαταλέγονται τα αρωματικά-φαρμακευτικά φυτά και τα βότανα. Το Μελισσόχορτο (*Melissa officinalis* L.), της οικογένειας *Lamiaceae*, αποτελεί ενδημικό φυτό της κεντρικής και νότιας Ευρώπης, ωστόσο, η καλλιέργεια του είναι πλέον διαδεδομένη σε παγκόσμιο επίπεδο. Συνήθως, καταναλώνεται ως αφέψημα χάρη στην καταπραϋντική και σπασμολυτική δράση του αλλά και ως μυρωδικό. Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια, χρησιμοποιείται και από τη βιομηχανία τροφίμων ως συντηρητικό.

Στη βιβλιογραφία συναντάται πλήθος μελετών που αφορούν στην ανάλυση βοτάνων και στις ωφέλιμες βιολογικές δράσεις τους στον ανθρώπινο οργανισμό. Παρόλο που η κατανάλωση αφεψημάτων έχει ενταχθεί πλέον στο Μεσογειακό πρότυπο διατροφής και βρίσκεται στη βάση της Μεσογειακής πυραμίδας, οι μελέτες σχετικά με τα αφεψήματα βοτάνων είναι πολύ περιορισμένες. Καθώς αυτή η μέθοδος παρασκευής αποτελεί τον πιο κοινό τρόπο κατανάλωσης τους από τον άνθρωπο αλλά και δεδομένου του γεγονότος ότι οι μελέτες που αφορούν στα φυτά της Ελληνικής χλωρίδας είναι ελάχιστες, κρίνεται αναγκαίο να διεξαχθεί περαιτέρω έρευνα σχετικά με αυτήν την κατηγορία τροφίμων προκειμένου να προσδιοριστούν οι ευεργετικές επιδράσεις τους στην υγεία και να διαλευκανθούν οι μηχανισμοί μέσω των οποίων αυτές εκδηλώνονται.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να προσδιοριστεί το περιεχόμενο του αφεψήματος Μελισσόχορτου σε φαινολικά συστατικά και να μελετηθεί η ικανότητά του να εκδηλώνει αντιοξειδωτική δράση. Αρχικά, έγινε προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου του αφεψήματος καθώς και του περιεχομένου σε ολικές φλαβονόλες και πτητικά συστατικά. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η ικανότητά του (α) να δεσμεύει την ελεύθερη ρίζα DPPH•, (β) να ανάγει τα ιόντα Fe^{3+} και (γ) να σχηματίζει χηλικά σύμπλοκα με τα κατιόντα των μεταβατικών μετάλλων σιδήρου (Fe^{2+}) και χαλκού (Cu^{2+}).

Επιπλέον, το αφέψημα μελετήθηκε για πιθανή εκδήλωση χημειοπροστατευτικής δράσης. Για το σκοπό αυτό έγινε έλεγχος της ικανότητάς του (α) να προκαλεί αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού *in vitro* σε κυτταρικές σειρές που έχουν απομονωθεί από ανθρώπινους όγκους του παχέος εντέρου (HT-29) και του προστάτη (PC3), (β) να επάγει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων και (γ) να επηρεάζει τα επίπεδα της προφλεγμονώδους κυτταροκίνης ιντερλευκίνης-8 (IL-8) Ακόμη, έγινε προσπάθεια διαλεύκανσης του μηχανισμού χημειοπροστατευτικής δράσης του αφεψήματος

ελέγχοντας (α) τα επίπεδα ενεργοποίησης του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα-κΒ (*NF-κB*) και (β) τα επίπεδα του ενδογενούς αντιοξειδωτικού μορίου της γλουταθειόνης (*GSH*).

Η θετική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης, η επιβεβαίωση τους με επιπλέον *in vitro* αλλά και *in vivo* μελέτες θα συμβάλλουν στην ανάδειξη του Μελισσόχορτου ως ένα λειτουργικό τρόφιμο που παρέχει σημαντικά οφέλη στην υγεία του καταναλωτή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ-ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Προετοιμασία Εκχυλίσματος Βοτάνου και Διαδικασία παραλαβής αφυδατωμένου αφεψήματος

Το βότανο που μελετήθηκε στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή ήταν το Μελισσόχορτο, το οποίο ανήκει στα είδη της Ελληνικής χλωρίδας και το οποίο προερχόταν από βιολογικές καλλιέργειες του νομού Αιτωλοακαρνανίας. Το βότανο παραλήφθηκε τυποποιημένο σε συσκευασία των 250g.

Ο Πίνακας 2.1 παρουσιάζει το είδος του βοτάνου που χρησιμοποιήθηκε για την παρούσα μελέτη.

Πίνακας 2.1: Βότανο- Μελισσόχορτο

Κοινή Ονομασία Βοτάνου	Επιστημονική Ονομασία Βοτάνου	Οικογένεια
Μελισσόχορτο (Lemon Balm)	<i>Melissa officinalis</i>	Lamiaceae

Αντιδραστήρια-Όργανα

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων

Γυάλινο σκεύος βρασμού

Μεταλλικό νερό

Θερμαντική πλάκα

Γυάλινο χωνί

Διηθητικό χαρτί

Ογκομετρικός κύλινδρος 250mL

Δοχεία με βιδωτο πώμα 100mL

Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες με βιδωτό πώμα καλυμμένο με Teflon 10mL

Parafilm

Βαθυκαταψύκτης -80°C

Καταψύκτης -20 °C

Συσκευή λυοφιλίωσης

Αναλυτική Πορεία

Ζυγίζονται 3g βοτάνου σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων και λαμβάνονται 250mL μεταλλικού νερού με ογκομετρικό κύλινδρο. Μεταφέρονται σε γυάλινο σκεύος βρασμού από βοριοπυριτικό γυαλί (pyrex) και, στη συνέχεια, αυτό

τοποθετείται σε προθερμασμένη εστία. Το σκεύος απομακρύνεται από την εστία 3 λεπτά μετά την έναρξη του βρασμού και η διαδικασία της εκχύλισης των συστατικών του συνεχίζει για ακόμα 2 λεπτά εκτός εστίας. Ακολούθως, μεταφέρεται για διήθηση σε ογκομετρικό κύλινδρο των 250mL. Στην περίπτωση που παρατηρείται ότι ο όγκος μετά τη διήθηση είναι μικρότερος από 200mL (απώλειες κατά το βρασμό $\pm 50\text{mL}$), γίνεται συμπλήρωση με κατάλληλη όγκο νερού έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι 200mL. Έπειτα, το αφέψημα μεταφέρεται σε δοχεία γνωστού όγκου (100mL), τα οποία καλύπτονται με parafilm και τοποθετούνται σε θάλαμο βαθιάς ψύξης (-80°C) για 24 ώρες. Μετά το πέρας των 24 ωρών, τα δοχεία μεταφέρονται στη συσκευή λυοφιλίωσης για 72 ώρες από όπου και παραλαμβάνονται αφυδατωμένα. Παράλληλα, γίνεται λυοφιλίωση και ίσου όγκου νερού σε αντίστοιχα δοχεία προκειμένου να εκτιμηθούν τα διαλυμένα άλατα νερού και να διορθωθούν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για το στερεό υπόλειμμα του αφεψήματος. Το στερεό υπόλειμμα παραλαμβάνεται και αφού ζυγισθεί, τοποθετείται σε γυάλινο φιαλίδιο με βιδωτό πώμα. Το φιαλίδιο μεταφέρεται, στη συνέχεια, για ψύξη στους -20°C όπου και αποθηκεύεται.

2.2 Ανάλυση Συστατικών του αφυδατωμένου αφεψήματος- Προσδιορισμός Πολυφαινολών

2.2.1 Προσδιορισμός συνολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Αντιδραστήρια- Όργανα

Αντιδραστήριο Folin Ciocalteu (FC, 2N)

Κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3 (20% w/v)

MeOH αναλυτικής καθαρότητας

Γαλλικό οξύ (Gallic acid, GA)

Απιονισμένο νερό

Φιαλίδια erpendorfs (1.5mL)

Αυτόματες πιπέτες (10-1000 μL)

Tips

Κυψελίδες

Αναδευτήρας vortex

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων

Αρχή της Μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στην πραγματοποίηση οξειδοαναγωγικής αντίδρασης με την οποία προσδιορίζεται το ολικό φαινολικό περιεχόμενο χωρίς να προσδιορίζονται μεμονωμένα τα μονομερή, τα διμερή και τα πολυμερή φαινολικά συστατικά. Το αντιδραστήριο Folin Ciocalteu αποτελεί διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων, τα οποία σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Οδηγεί στην οξείδωση των φαινολικών ιόντων με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:



Το προϊόν που σχηματίζεται από την αντίδραση είναι σύμπλοκο μολυβδαινίου-βολφραμίου (Mo- W) που φέρει χαρακτηριστικό μπλε χρώμα και το οποίο απορροφά στο φάσμα του ορατού (750nm). Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3 (20% w/v). Το διάλυμα αυτό δε διαταράσσει τη σταθερότητα του αντιδραστηρίου Folin Ciocalteu και του προϊόντος της αντίδρασης ενώ, παράλληλα, αποτελεί προϋπόθεση για την παρουσία των φαινολικών ιόντων.

Αναλυτική Πορεία

Αρχικά, μεταφέρονται σε φιαλίδια erpendorf 790μL απιονισμένου νερού. Για την παρασκευή του τυφλού δείγματος προστίθενται στο erpendorf 10μL καθαρής μεθανόλης ενώ για την παρασκευή του δείγματος με το αφυδατωμένο αφέψημα προστίθενται 10μL διαλύματος αφυδατωμένου αφεψήματος με συγκέντρωση 4mg/mL, το οποίο έχει προκύψει από τη διαλυτοποίηση του στερεού υπολείμματος του αφεψήματος σε μεθανόλη. Στη συνέχεια, προστίθενται 50μL από το αντιδραστήριο Folin Ciocalteu και ακολουθεί ανάδευση στο vortex για 1 λεπτό. Έπειτα, προστίθενται 150μL κορεσμένου διαλύματος Na_2CO_3 (20% w/v), το μίγμα αναδεύεται ξανά και αφήνεται για επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και υπό συνθήκες σκότους. Το προϊόν της αντίδρασης φωτομετρείται στα 750nm ως προς το λευκό δείγμα και κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg ισοδυνάμων γαλλικού οξέος (gallic acid equivalents, GAE).

Κατασκευή Πρότυπης καμπύλης αναφοράς για το γαλλικό οξύ (GA)

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης παρασκευάζονται διαλύματα γαλλικού οξέος (GA) με συγκεντρώσεις 25, 50, 100, 200, 400, 600 και 800mg/mL. Ακολουθείται η

διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω και οι μετρήσεις που προκύπτουν χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος της μορφής $y = f(x)$, όπου στον άξονα των y αποδίδονται οι τιμές της απορρόφησης στα 750nm και στον άξονα των x αποδίδονται οι διαφορετικές τιμές της συγκέντρωσης των διαλυμάτων γαλλικού οξέος σε mg/mL.

2.2.2 Προσδιορισμός ολικών φλαβονολών

Αντιδραστήρια- Όργανα

AlCl₃ (2% σε 5% CH₃COOH σε MeOH)

CH₃COOH (5% σε MeOH)

MeOH αναλυτικής καθαρότητας

Ρουτίνη, πρότυπη ουσία

Αυτόματες πιπέτες (10-1000μL)

Tips

Φιαλίδια erpendorfs (1.5mL)

Κυψελίδες

Ογκομετρικές φιάλες όγκου 250mL

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων

Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης

Αναλυτική Πορεία

Σε φιαλίδιο erpendorf προστίθενται 50μL AlCl₃, 500μL διαλύματος αφυδατωμένου αφεψήματος συγκέντρωσης 2mg/mL, το οποίο έχει προκύψει από διαλυτοποίηση του στερεού υπολείμματος του αφεψήματος σε μεθανόλη, και 500μL CH₃COOH. Το μίγμα αφήνεται για επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και, ακολούθως, μετράται η απορρόφηση στα 415nm. Η συγκέντρωση των φλαβονολών στο δείγμα του αφεψήματος υπολογίζεται χρησιμοποιώντας πρότυπη καμπύλη αναφοράς ρουτίνης και εκφράζεται ως ισοδύναμα ρουτίνης.

Κατασκευή Πρότυπης καμπύλης αναφοράς για τη ρουτίνη

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς παρασκευάζονται διαλύματα ρουτίνης με συγκεντρώσεις 1, 2, 4, 6, 8 και 10μg/mL και ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως. Οι μετρήσεις που προκύπτουν χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος της μορφής $y = f(x)$, όπου στον άξονα των y αποδίδονται οι τιμές

της απορρόφησης στα 415nm και στον άξονα των x αποδίδονται οι διαφορετικές τιμές της συγκέντρωσης των διαλυμάτων ρουτίνης σε µg/mL.

2.2.3 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός απλών φαινολών και τερπενικών οξέων με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματοσκοπία/ φασματομετρία μάζας (Gas Chromatography- Mass Spectrometry, GC-MS)

Αντιδραστήρια- Όργανα

Ήλιο υψηλής καθαρότητας (99.999%)

Διάλυμα 2mg/L 3-(4-υδροξύ-φαινυλ)-1- προπανόλης

BSTFA (N,O- Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide

Σφραγιζόμενα φιαλίδια GC (GC vials, χωρητικότητας 1.5mL)

Πώματα για φιαλίδια GC

Δοκιμαστικοί σωλήνες με βιδωτό πώμα

Αυτόματες πιπέτες (10-1000µL)

Tips

Φιαλίδια erpendorfs (1.5mL)

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων

Συσκευή αέριας χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματοφωτόμετρο μάζας (GC-MS)

Τριχοειδής στήλη HP-5 MS (5- φαινυλο-95% μεθυλοσιλοξάνιο, 30m x 0.25mm x 250µm)

Εξάρτημα για το σφράγισμα των φιαλιδίων GC

Υδατόλουτρο

Αρχή της Μεθόδου

Ο διαχωρισμός των διαφόρων συστατικών ενός μίγματος επιτυγχάνεται λόγω των διαφορετικών δυνάμεων συγκράτησης και έκλουσης μεταξύ των συστατικών του δείγματος, του υλικού πληρώσεως της στήλης ή του υλικού που καλύπτει εσωτερικά τη στήλη και της ροής του φέροντος αερίου.

Αναλυτική Πορεία

Σε πρώτο στάδιο, το αφυδατωμένο αφέψημα φέρεται σε θερμοκρασία δωματίου και, ακολούθως, ζυγίζεται κατάλληλη ποσότητα από αυτό σε φιαλίδιο αέριας χρωματογραφίας (GC vial, χωρητικότητας 1.5mL). Αρχικά, προστίθενται στο φιαλίδιο 50µL από το

εσωτερικό πρότυπο και, στη συνέχεια, το δείγμα εξατμίζεται μέχρι ξηρού σε φυγοκεντρικό εξατμιστήρα (Speedvac) ή σε ρεύμα αζώτου. Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία, προστίθενται 250μL αντιδραστηρίου σιλυλίωσης (BSTFA) ούτως ώστε οι πολυφαινόλες να μετατραπούν σε πτητικά παράγωγα, συγκεκριμένα στους τριμεθυλ-σιλυλιωμένους εστέρες τους (TMS). Έπειτα τα δείγματα σφραγίζονται και μεταφέρονται σε υδατόλουτρο στους 70° C για 20 λεπτά προκειμένου να ολοκληρωθεί η σιλυλίωση. Μετά το τέλος της σιλυλίωσης, τα δείγματα μπορούν να μετρηθούν στη συσκευή αέριας χρωματογραφίας, η οποία είναι συζευγμένη με φασματοφωτόμετρο μάζας (GC-MS).

Προκειμένου να προσδιοριστούν ποσοτικά τα συνολικά 30 φαινολικά συστατικά και τερπενικά οξέα για τα οποία υπάρχουν πρότυπες ουσίες, χρησιμοποιείται η μέθοδος επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (Selective Ion Monitoring, SIM) GC-MS. Ο προσδιορισμός των διαφόρων συστατικών βασίζεται στην παρουσία 2 ή 3 ιόντων για κάθε φαινολικό συστατικό σε χρόνο κατακράτησης $RT \pm 0.05$ του χρόνου κατακράτησης για το αντίστοιχο πρότυπο. Πιο αναλυτικά, τα προς ανάλυση συστατικά εισέρχονται μέσω ενός τετράπολου στο φασματογράφο μάζας όπου και «βομβαρδίζονται» από ελεύθερα ηλεκτρόνια τα οποία εκπέμπονται από ένα νήμα (filament). Τα ελεύθερα ηλεκτρόνια επιταχύνονται (70eV) και «βομβαρδίζουν» τα μόρια, τα οποία εισέρχονται κάθετα προς τη δέσμη των ηλεκτρονίων, δημιουργώντας χαρακτηριστικά και αναπαραγώγιμα θραύσματα.

Στη συνέχεια, τα θετικά ιόντα μετακινούνται στον αναλυτή μάζας λόγω της παρουσίας απωθόντος ηλεκτροδίου (repeller). Το ιόν- στόχος, στο οποίο και βασίζεται ο ποσοτικός προσδιορισμός, συμβολίζεται με T και τα ιόντα που παρακολουθούνται και καταγράφονται για την επιβεβαίωση της παρουσίας κάθε πολικής φαινόλης στο δείγμα συμβολίζονται με Q1 και Q2. Τα ιόντα που παρακολουθούνται και καταγράφονται (T, Q1, Q2) για κάθε ένα από τα 30 φαινολικά συστατικά και τερπενικά οξέα παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2: Ιόντα-στόχοι, ιόντα επιβεβαίωσης και χρόνοι κατακράτησης (RT) των φυτοχημικών συστατικών που αναμένεται να ανιχνευθούν στα αφεψήματα των βοτάνων και του εσωτερικού προτύπου.

A/A	Συστατικό	RT (min)	Ιόν- στόχος Target ion (m/z)	Ιόντα επιβεβαίωσης Qualifier ions Q ₁ , Q ₂ (m/z)
1	Βαννιλίνη	17,26	194	209
2	Κινναμωμικό οξύ	17,51	205	220
3	Τυροσόλη	18,28	179	267, 282
4	<i>p</i> - Υδροξυβενζοϊκό οξύ	19,66	267	223, 193
5	<i>p</i> -Υδροξυφαινυλοξικό οξύ	20,12	252	296, 281
6	3-(4- υδροξυφαινυλ)-1- προπανόλη <i>Εσωτερικό πρότυπο</i>	21,92	206	191, 179
7	Ομοβανιλική αλκοόλη	23,03	205	179
8	Φλωρετικό οξύ	25,55	192	310
9	Βανιλικό οξύ	25,94	297	267, 312
10	Ομοβανιλικό οξύ	27,25	326	267, 311
11	<i>ο</i> - Κουμαρικό οξύ	28,74	293	308, 147
12	Πρωτοκατεχικό οξύ	29,96	193	355, 370
13	3,4-Διυδροξυφαινυλοξικό οξύ	30,84	384	267, 179
14	Συριγγικό οξύ	34,43	327	342, 312

15	p- Κουμαρικό οξύ	35,42	308	293, 219
16	Γαλλικό οξύ	36,39	281	458, 443
17	Φερουλικό οξύ	38,57	338	323, 308
18	Καφεϊκό οξύ	39,28	396	219, 381
19	Σιναπικό οξύ	40,58	368	353, 338
20	Ρεσβερατρόλη	44,9	444	445, 443
21	Χρυσίνη	45,3	383	384
22	Επικατεχίνη	46,08	368	355, 474
23	Ναρινγκενίνη	46,13	473	296
24	Κατεχίνη	46,26	368	355, 474
25	Γενιστεΐνη	46,73	473	
26	Καμπφερόλη	48	559	560
27	Χλωρογενικό οξύ	48,6	345	307, 324
28	Κερκετίνη	49,27	647	559, 575
29	Μυρισετίνη	49,97	735	647, 575
30	Ολεανολικό οξύ	56,38	203	320, 482
31	Ουρσολικό οξύ	57,43	203	320, 482

Ο ποσοτικός προσδιορισμός γίνεται με τη μέθοδο εσωτερικού προτύπου, με τη χρήση μεθανολικού διαλύματος 3-(4-υδρόξυ-φαινυλ)-1-προπανόλης 2mg/L. Η συγκεκριμένη

ένωση δεν περιέχεται στο υπό ανάλυση δείγμα και η κορυφή της είναι ευδιάκριτη και διαχωρίζεται από τα άλλα συστατικά. Η ποσοτικοποίηση με εσωτερικό πρότυπο γίνεται βάσει σειράς 9 πρότυπων μιγμάτων φαινολικών και τερπενικών συστατικών, τα οποία περιέχουν την ίδια ποσότητα εσωτερικού προτύπου που περιέχεται και στο δείγμα. Το πρόγραμμα της θερμοκρασίας του φούρνου ρυθμίζεται όπως περιγράφεται ακολούθως στον Πίνακα 2.3.

Πίνακας 2.3: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα για τον προσδιορισμό απλών πολυφαινολών και τερπενικών οξέων με τη μέθοδο GC/MS.

Στάδιο ανάλυσης	Θερμοκρασία φούρνου
Αρχική	70°C για 5min
1η άνοδος	15°C/min μέχρι 130°C
2η άνοδος	4°C/min μέχρι 160°C, παραμονή για 15min
3η άνοδος	10°C/min μέχρι 300°C
Τελική	παραμονή σε 300°C για 15min

2.2.4 Ποιοτικός προσδιορισμός φαινολικών συστατικών του αφυδατωμένου αφεψήματος με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας- φασματομετρίας μάζας (Liquid Chromatography- Mass Spectrometry, LC-DAD-MS)

Αντιδραστήρια- Όργανα

Οξικό οξύ 2.5% σε νερό

MeOH

Αντλία χρωματογράφου, Finnigan MAT Spectra System P4000

Ανιχνευτής υπεριώδους σειράς διοδίων, Finnigan SpectraSystem UV 6000LP

Φασματογράφος μαζών, Finnigan AQA

Αναλυτική στήλη Superspher της Phenomenex, 100RP-18, 4u end-capped (125x2.0mm)

Αρχή της Μεθόδου

Η μέθοδος της υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματοσκοπία μαζών ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό και ανιχνευτή ορατού υπεριώδους σειράς διόδων αποτελεί μια υψηλής πιστότητας και ιδιαίτερα αποτελεσματική μέθοδο για την εκτίμηση της ταυτότητας των μη πτητικών ουσιών που υπάρχουν σε ένα μείγμα. Αναλυτικότερα, το

διάλυμα των προς ανάλυση ουσιών εξέρχεται από τη χρωματογραφική στήλη και ακολουθεί ψεκασμός με τη χρήση αζώτου σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και τάσης. Τα φορτισμένα σταγονίδια συρρικνώνονται όσο εξατμίζεται ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης και η πυκνότητα του φορτίου τους αυξάνεται μέχρι του ορίου Rayleigh. Τότε λαμβάνει χώρα βίαιη απώθηση, η οποία καλείται ιοντική εξάτμιση ή Κουλομπική έκρηξη, και είναι αυτή που οδηγεί στη δημιουργία των προς ανάλυση «αιωρούμενων» σωματιδίων υπό τη μορφή απλών ιόντων ή ιόντων ριζών. Τα τελευταία ανιχνεύονται σε χώρο υψηλού κενού με την τεχνολογία της φασματοσκοπίας μάζας.

Αναλυτική Πορεία

Το αφυδατωμένο δείγμα του αφεψήματος διαλυτοποιείται σε μεθανόλη και αναλύεται με τη διάταξη LC-MS, η οποία αποτελείται από το σύστημα Finnigan MAT Spectra System P4000 (αντλία χρωματογραφίας), το σύστημα Finnigan Spectra System UV 6000LP (ανιχνευτή διόδων) και το φασματογράφο μαζών Finnigan AQA. Ο διαχωρισμός γίνεται σε στήλη Superspher, 100 RP-18, 4u end-capped (125x2.0 mm) (Phenomenex) με ροή 0.3 mL/min στους 40° C. Οι απορροφήσεις των εκλούμενων συστατικών καταγράφονται στα 278, 340 και 230-550 nm. Το προτεινόμενο πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.4. Αξίζει να σημειωθεί ότι η συγκεκριμένη μέθοδος θεωρείται ιδανική για την ταυτοποίηση φαινολικών συστατικών με θετικό ή αρνητικό ιονισμό και χρωματογραφικές στήλες ανάστροφης φάσης.

Πίνακας 2.4 Πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης των συστατικών του αφυδατωμένου αφεψήματος (δείγματος).

t (min)	A	B
0	100	0
2	100	0
52	0	100
60	0	100
65	100	0

A: Οξικό οξύ 2,5% σε νερό, **B:** Μεθανόλη

Για τη φασματοσκοπία μαζών: Ηλεκτροψεκασμός σε 400°C και 4.00 kV. Η κινητική ενέργεια θραυσματοποίησης είναι 20 και 70 eV. Το εύρος μαζών τίθεται μεταξύ 121-787 amu, με ρυθμό σάρωσης 0,8 sec⁻¹. Στην περίπτωση που απαιτείται, γίνονται τροποποιήσεις

των προτεινόμενων συνθηκών κατά την εξέλιξη των αναλύσεων, για βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων και διόρθωση παρεκκλίσεων.

2.2.5 Ποιοτικός προσδιορισμός πτητικών συστατικών με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας- φασματοσκοπίας/ φασματομετρίας μάζας (Gas Chromatography- Mass Spectrometry, GC-MS)

Ο προσδιορισμός των πτητικών συστατικών πραγματοποιείται με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας- φασματοσκοπίας μάζας (GC/MS).

Αντιδραστήρια- Όργανα

Αέριο He

Διαιθυλαιθέρας

Σφραγιζόμενα φιαλίδια GC (GC vials, χωρητικότητας 1.5mL)

Πώματα για τα φιαλίδια GC

Εξάρτημα για το σφράγισμα των φιαλιδίων GC

Εκχυλιστική χοάνη

Αέριος χρωματογράφος (GC) (6890N Agilent Technologies)

Περιστροφικός συμπυκνωτής κενού

Αναλυτική Πορεία

Αφου ολοκληρωθεί η παρασκευή του αφεψήματος με τον τρόπο που περιγράφηκε στην παράγραφο 2.1, γίνεται παραλαβή των πτητικών συστατικών που υπάρχουν στο αφέψημα με τη διαδικασία της εκχύλισης με οργανικό διαλύτη (αιθέρα). Η διαδικασία πραγματοποιείται 3 φορές. Η οργανική φάση συμπυκνώνεται και φυλάσσεται σε ειδικά φιαλίδια GC μέχρι την ανάλυση. Η ταυτοποίηση των ενώσεων που εντοπίζονται στηρίζεται στη σύγκρισή τους με ενώσεις που έχουν αναγνωριστεί και καταχωρηθεί σε βάσεις δεδομένων. Αυτές οι βάσεις δεδομένων αποτελούν βιβλιοθήκες φασμάτων μαζών, οι οποίες περιέχουν το «αποτύπωμα» κάθε ένωσης. Οι βιβλιοθήκες που χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων είναι οι Adams 07, NIST 98 και Wiley 275. Τα ποσοστά % των ενώσεων λαμβάνονται ηλεκτρονικά από το εμβάδον κάθε κορυφής του χρωματογραφήματος και την αναγωγή του σε ποσοστό.

Αρχικά εισάγεται με ένεση 1 μL από το δείγμα στον αέριο χρωματογράφο. Ο αέριος χρωματογράφος που χρησιμοποιήθηκε είναι σύστημα της Agilent (Wallbronn, Germany) HP Series 6890N εφοδιασμένος με ανιχνευτή HP 5973MS (EI ηλεκτρονικού ιονισμού

70eV), εισαγωγή split-splitless και αυτόματο δειγματολήπτη HP7683. Για το διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε τριχοειδής στήλη HP-5MS με επικάλυψη 5%-φαινυλο-95%-μεθυλοσιλοξάνιο, μήκους 30m με εσωτερική διάμετρο 0.25mm και πάχος εσωτερικής επίστρωσης (film) 0.25μm. Ο εισαγωγέας τέθηκε στους 220°C και η γραμμή μεταφοράς του δείγματος από την αέρια χρωματογραφική στήλη στον ανιχνευτή μάζας (MSD transfer line) στους 300°C. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε αέριο He υψηλής καθαρότητας με ροή 1mL/min ενώ η εισαγωγή του δείγματος (1μL) έγινε splitless. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα του φούρνου του αερίου χρωματογράφου που εφαρμόστηκε για το διαχωρισμό περιγράφεται στον Πίνακα 2.5.

Πίνακας 2.5 Θερμοκρασιακό πρόγραμμα για τον προσδιορισμό των πτητικών συστατικών του δείγματος με τη μέθοδο GC/MS.

Στάδιο ανάλυσης	Θερμοκρασία φούρνου
Αρχική	40°C παραμονή επι 0min
1η άνοδος	3°C/min μέχρι 220°C, παραμονή 0min
2η άνοδος	18°C/min μέχρι 320°C
Τελική	320°C, παραμονή 4min
Συνολικός Χρόνος (Run Time)	69.56 min

2.3 Αντιοξειδωτικές Δοκιμές

2.3.1 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιζόμενη στη δέσμευση της 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλο-υδραζύλο ελεύθερης ρίζας (DPPH•)

Αντιδραστήρια- Όργανα

Σταθερή ελεύθερη ρίζα DPPH• (2,2-διφαινυλ-1-πικρυδυλδραζυλ-)

Trolox (6-υδροξυ-2,5,7,8-τετραμεθυλχρωμαν-2-καρβοξυλικό οξύ)

Διάλυμα DPPH• σε MeOH (3.9mg σε 100mL)

MeOH αναλυτικής καθαρότητας

Αυτόματες πιπέτες (10-1000μL)

Tips

Φιαλίδια eppendorfs (1.5mL)

Κυψελίδες χαλαζία

Αναδευτήρας vortex

Συσκευή υπερήχων (Sonicator Elmasonic S60)

Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης

Αρχή της Μεθόδου

Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών ουσιών να δεσμεύουν τη σταθερή ελεύθερη ρίζα DPPH•. Η δέσμευση αυτής της ελεύθερης ρίζας έχει ως αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος. Η απορρόφηση μετράται στα 515nm.

Αναλυτική Πορεία

Σε φιαλίδια erppendorfs προστίθενται 25μL διαλυτοποιημένου σε MeOH στερεού υπολείμματος του αφεψήματος (συγκέντρωση 2mg/mL) ή 25μL MeOH για το λευκό προσδιορισμό. Στη συνέχεια, προστίθενται στα erppendorfs 975μL διαλύματος DPPH• Ακολουθεί ανάδευση σε vortex και το μίγμα αφήνεται για επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και σε συνθήκες σκότους. Η απορρόφηση μετράται στα 515nm σε 2 χρόνους, σε $t = 0$ λεπτά (A^0_{515}) και σε $t = 30$ λεπτά (A^{30}_{515}). Τα αποτελέσματα υπολογίζονται χρησιμοποιώντας πρότυπη καμπύλη αναφοράς και εκφράζεται ως ισοδύναμα Trolox, που είναι ανάλογο της βιταμίνης E (Trolox equivalents, TE). Η διαδικασία επαναλαμβάνεται εις τριπλούν.

Κατασκευή Πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς παρασκευάζονται διαλύματα Trolox με συγκεντρώσεις 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.4 και 1,6mM και ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Οι μετρήσεις που προκύπτουν χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος της μορφής $y = f(x)$, όπου στον άξονα των y αποδίδεται η % ΔA_{515} και στον άξονα των x αποδίδονται οι διαφορετικές τιμές της συγκέντρωσης των διαλυμάτων Trolox (ποσότητα Trolox) σε mM.

$$\text{Όπου } \% \Delta A_{515} = [(A^0_{515} - A^{30}_{515}) / A^0_{515}] \times 100$$

2.3.2 Προσδιορισμός αναγωγικής ικανότητας μέσω αναγωγής του Fe^{3+} σε Fe^{2+} (FRAP) ή Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιζόμενη στην αναγωγή του Fe^{3+} σε Fe^{2+} (FRAP)

Αντιδραστήρια- Όργανα

FeCl₃ (3mM σε 5mM HCl)

TPTZ [(2,4,6-tripyridyl-S-triazine), (2,4,6- τριπυριδυλο-S-τριαζίνη)] 1mM σε 0.05M HCl

Απιονισμένο νερό
Αυτόματες πιπέτες (100-1000μL)
Tips
Φιαλίδια erpendorfs (1.5mL)
Κυψελίδες χαλαζία
Αναδευτήρας vortex
Υδατόλουτρο
Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης

Αρχή της Μεθόδου

Η δοκιμή FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) μετράει την αντιοξειδωτική δράση όλων των συστατικών του διαλύματος της αντίδρασης που μπορούν να δράσουν αναγωγικά, μετρώντας την αναγωγική τους δύναμη. Η δοκιμή FRAP βασίζεται στη δυνατότητα των συστατικών του δείγματος να ανάγουν το σύμπλοκο TPTZ-Fe (III) σε έγχρωμο (μπλε) σύμπλοκο TPTZ-Fe (II).

Αναλυτική Πορεία

Σε ένα φιαλίδιο erpendorf αναμιγνύονται 50μL διαλύματος αφυδατωμένου αφεψήματος (συγκέντρωση 2mg/mL), το οποίο έχει διαλυτοποιηθεί σε MeOH, με 50μL FeCl₃ για την παρασκευή του δείγματος. Ανάλογα, για την παρασκευή του λευκού δείγματος, αναμιγνύονται 50μL δείγματος με 50μL απιονισμένου νερού. Γίνεται ανάδευση σε vortex και το μίγμα αφήνεται για 30 λεπτά προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αντίδραση σε υδατόλουτρο 37°C. Ακολούθως, προστίθενται 900μL διαλύματος TPTZ και γίνεται και πάλι ανάδευση. Ο δισθενής σίδηρος (Fe²⁺) που έχει σχηματιστεί δημιουργεί έγχρωμο (μπλε) σύμπλοκο με το αντιδραστήριο TPTZ. Το δείγμα παραμένει σε συνθήκες σκότους για 10 λεπτά και, στη συνέχεια, γίνεται μέτρηση της απορρόφησης στα 620nm. Παράλληλα, κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς για το ασκορβικό οξύ και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα ασκορβικού οξέος (Ascorbic acid equivalents, AAE). Η διαδικασία επαναλαμβάνεται εις τριπλούν.

Κατασκευή Πρότυπης καμπύλης αναφοράς για το ασκορβικό οξύ

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς παρασκευάζονται διαλύματα ασκορβικού οξέος με συγκεντρώσεις 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 και 0.5mM και ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Οι μετρήσεις που προκύπτουν χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος της μορφής $y = f(x)$, όπου στον άξονα

των y αποδίδονται οι τιμές της απορρόφησης στα 620nm και στον άξονα των x αποδίδονται οι διαφορετικές τιμές της συγκέντρωσης των διαλυμάτων ασκορβικού οξέος σε mM.

2.3.3 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιζόμενη στη δημιουργία χηλικών συμπλόκων με κατιόντα μετάλλων

2.3.3.1 Ικανότητα δημιουργίας χηλικών συμπλόκων με κατιόντα σιδήρου (Fe^{2+}) με τη χρήση φεροζίνης

Αντιδραστήρια- Όργανα

Απιονισμένο νερό (dH₂O)

Φεροζίνη(4-[3-(2-πυριδινυλ)-6-(4-σουλφονυλφαινυλ)-1,2,4-τριαζινο-5-υλ]βενζολοσουλφονικό νάτριο)

Ένυδρος χλωριούχος σίδηρος ($FeCl_2 \times 4H_2O$)

Αυτόματες πιπέτες (10-1000μL)

Tips

Φιαλίδια erpendorfs (1.5mL)

Πολυστυρενικό τρυβλίο 96 βοθρίων (96-well plate)

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων

Καταψύκτης -20° C

Φωτόμετρο ELISA (ELISA reader)

Αρχή της Μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα που έχουν οι αντιοξειδωτικές ουσίες να δεσμεύουν κατιόντα μετάλλων δημιουργώντας σταθερά χηλικά σύμπλοκα με αυτά. Η δημιουργία των συμπλόκων οδηγεί στον αποχρωματισμό του διαλύματος.

Αναλυτική Πορεία

Σε φιαλίδια erpendorfs προστίθενται 50μL αφυδατωμένου αφεψήματος, διαλυτοποιημένου σε απιονισμένο νερό, σε συγκεντρώσεις 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 20 και 25mg/mL για την παρασκευή των δειγμάτων, 750μL απιονισμένου νερού και 12.5μL $FeCl_2$ (2mM) ή απιονισμένου νερού για την παρασκευή του λευκού δείγματος. Ακολουθεί ανάδευση σε vortex και, στη συνέχεια, τα φιαλίδια αφήνονται για 10 λεπτά σε συνθήκες σκότους. Τέλος, προστίθενται 50μL φεροζίνης (5mM), γίνεται ανάδευση και, έπειτα,

επώαση για 5 λεπτά σε συνθήκες σκότους. Η απορρόφηση μετράται στα 562nm και η % ικανότητα δέσμευσης των ιόντων σιδήρου υπολογίζεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$\text{Συμπλεκτική ικανότητα \%} = [(A_0 - A_s)/A_0] \times 100$$

Όπου: A_0 , η απορρόφηση του λευκού δείγματος και

A_s , η απορρόφηση του δείγματος

Ως θετικό κοντρόλ (που εκφράζει την 100% σύμπλεξη) μετράται η συμπλεκτική ικανότητα του EDTA με την ίδια μέθοδο. Για όλα τα δείγματα η διαδικασία πραγματοποιείται 3 φορές.

2.3.3.2 Ικανότητα δημιουργίας χηλικών συμπλόκων με κατιόντα χαλκού (Cu^{2+}) με τη μέθοδο της Διαφορικής Παλμικής Ανοδικής Αναδιαλυτής Βολταμμετρίας (Differential Pulse Anodic Stripping Voltametry, DPASV)

Αντιδραστήρια- Όργανα

Δις απιονισμένο νερό (ddH₂O)

Χλωριούχο Νάτριο (NaCl) 3M

Πυκνό υδροχλωρικό οξύ HCl

Διάλυμα νιτρικού χαλκού

Αυτόματες πιπέττες (100-1000 μL)

Tips

Δοχεία Teflon με πώμα (nalgene)

Ογκομετρικές φιάλες (100 mL)

Λάμπα UV

Σύστημα διασύνδεσης (interface) με μικροεπεξεργαστή

Ηλεκτρονικό υπολογιστή

Σύστημα μέτρησης (measuring stand), το οποίο περιλαμβάνει:

✚ Ποτενσιοστάτη

✚ Ενισχυτή μέτρησης ρεύματος για τη μέτρηση – καταγραφή της έντασης του ρεύματος

✚ Αναλογικο- ψηφιακό μετατροπέα

✚ Ψηφιακο- αναλογικό μετατροπέα

✚ Ρυθμιστές βαλβίδων αερίων

✚ Κυψελίδα μέτρησης τριών ηλεκτροδίων (εργασίας, Hg- αναφοράς, Ag/ AgCl- βοηθητικό) με αναδευτήρα

Αρχή της Μεθόδου

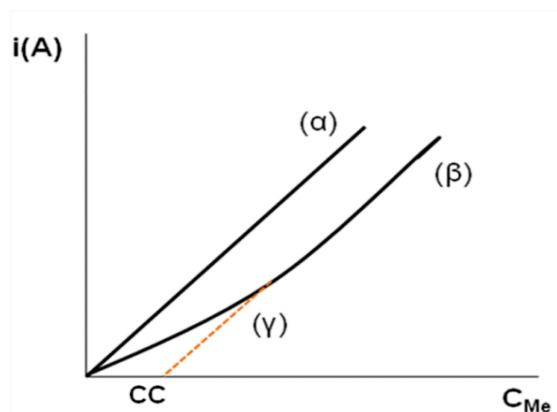
Η παρούσα μέθοδος χρησιμοποιείται με σκοπό να προσδιοριστεί η ικανότητα του αφυδατωμένου αφεψήματος να συμπλέκει ιόντα χαλκού και γίνεται με τη χρήση σταγονικού ηλεκτροδίου υδραργύρου. Στην πρώτη φάση (φάση συσσώρευσης) ο αναλύτης αποτίθεται στο ηλεκτρόδιο εργασίας σε σταθερό δυναμικό και με το διάλυμα υπό συνεχή ανάδευση. Είναι σημαντικό, να γίνεται αυστηρός έλεγχος των συνθηκών εργασίας ούτως ώστε οι μετρήσεις που λαμβάνονται να είναι επαναλήψιμες/ αναπαραγώγιμες (χρόνος απόθεσης- δυναμικό απόθεσης- σχήμα- μέγεθος & διάταξη αναδευτήρα- ταχύτητα περιστροφής- όγκος δείγματος- επιφάνεια ηλεκτροδίου). Στη δεύτερη φάση παύει η ανάδευση του διαλύματος και, ακολούθως, παραμένει σε ηρεμία οπότε παρατηρείται μείωση του καθοδικού ρεύματος λόγω έλλειψης συναγωγής. Το διάλυμα έρχεται σε ισορροπία και το αποτεθέν μέταλλο κατανέμεται ομοιόμορφα στη σταγόνα υδραργύρου. Στην τρίτη φάση, καθορίζεται ο ρυθμός σάρωσης δυναμικού που αντιστοιχεί στο ρυθμό κατά τον οποίο καταγράφεται το ανοδικό αναδιαλυτικό βολταμμογράφημα ενώ, στην τέταρτη φάση, το μετρούμενο σήμα είναι το ρεύμα το οποίο στην τρίτη φάση μεταβάλλεται στο ανοδικό ρεύμα για την αναδιάλυση του ηλεκτροδίου υδραργύρου.

Η συσσώρευση, δηλαδή η ποσότητα του μετάλλου που αποτίθεται καθοδικά ή η συγκέντρωση του μετάλλου στο αμάλγαμα εξαρτάται από το ρεύμα ηλεκτρόλυσης, τη διάρκεια συσσώρευσης και τον όγκο της σταγόνας Hg. Στην Ανοδική Αναδιαλυτή Βολταμμετρία (ASV) ο προσδιορισμός βασίζεται στην ανοδική αναδιάλυση του συσσωρευμένου αναλύτη. Η διαδικασία αυτή ακολουθείται βολταμμετρικά και παράγει μια κορυφή ρεύματος η οποία είναι ανάλογη του ρυθμού σάρωσης του δυναμικού και της ακτίνας της σταγόνας υδραργύρου (Hg).

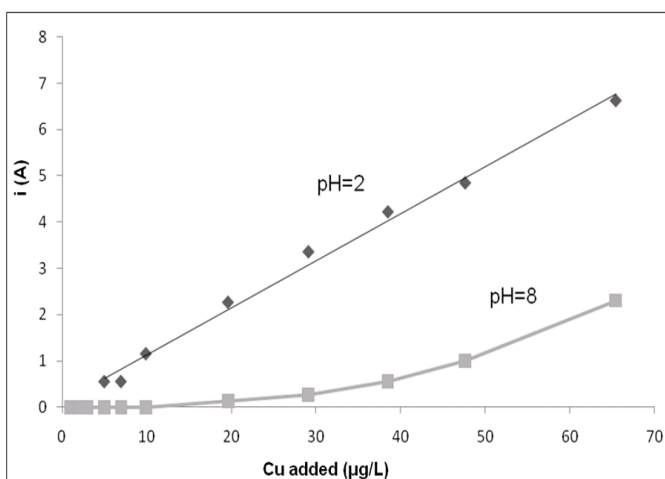
Αναλυτική Πορεία

Σε πρώτο στάδιο γίνεται η παρασκευή του διαλύματος χαλκού που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σε πλαστικό δοχείο των 100mL. Ακολουθεί η διαλυτοποίηση του αφυδατωμένου αφεψήματος σε δις απιονισμένο νερό (ddH₂O) με τελικό όγκο 100mL και η αποθήκευσή του στους 2° C. Στη συνέχεια, μεταφέρονται 40mL διαλυτοποιημένου αφεψήματος σε κυψελίδα μέτρησης τριών ηλεκτροδίων αφού προηγηθεί η προσθήκη 10 σταγονών χλωριούχου νατρίου (NaCl, 3M). Η συμπλεκτική ικανότητα του χαλκού προσδιορίζεται μετά από διαδοχική προσθήκη διαλύματος χαλκού γνωστού όγκου στο υπό εξέταση δείγμα. Τέλος, μεταφέρονται 40mL διαλυτοποιημένου αφεψήματος σε δοχείο Teflon και γίνεται ρύθμιση του pH (pH=2) μέσω της προσθήκης διαλύματος πυκνού υδροχλωρικού οξέος. Το τελικό διάλυμα ακτινοβολείται με UV ακτινοβολία για 12 ώρες και προσδιορίζεται η ποσότητα του μετάλλου σε μηδενική συγκέντρωση υποκαταστατών.

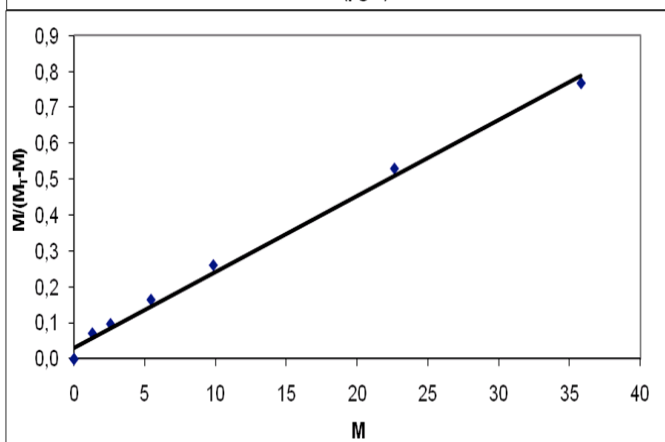
Ο προσδιορισμός της συμπλεκτικής ικανότητας μετάλλου (CCCu) σε αδρανή συστήματα βασίζεται σε διαγράμματα (Διάγραμμα 2.1), τα οποία αναπαριστούν τη μετρούμενη ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος (*i*) συναρτήσει της συγκέντρωσης του μετάλλου (CCu) (γίνεται προσθήκη γνωστής ποσότητας) και τα οποία εξαρτώνται από την ισχύ της σύμπλεξης. Με βάση τα συγκεκριμένα διαγράμματα, η συμπλεκτική ικανότητα προσδιορίζεται με προέκταση του ευθύγραμμου τμήματος της καμπύλης β στον άξονα των τετμημένων (ευθεία γ). Συγκεκριμένα, οι τιμές της συμπλεκτικής ικανότητας και της αντίστοιχης σταθεράς σχηματισμού συμπλόκων χαλκού (logK) υπολογίζονται με εφαρμογή του διαγράμματος που προτάθηκε από τον Ružić (1982). Λαμβάνεται η ευθεία καμπύλη του λόγου $M/(MT-M)$ (άξονας ψ) ως προς M (άξονας χ) όπου M είναι το ελεύθερο μεταλλικό ιόν και MT-M είναι το συμπλεγμένο μέταλλο (MT είναι η συνολική ποσότητα του μετάλλου). Η σταθερά σχηματισμού (K) προσδιορίζεται από την τεταγμένη επί την αρχή της ευθείας (τεταγμένη = $1/K \cdot LT$), ενώ από την κλίση της ευθείας (κλίση = $1/LT$) προσδιορίζεται η συμπλεκτική ικανότητα των ιόντων χαλκού (LT) (Διαγράμματα 2.2, 2.3).



Διάγραμμα 2.1: Διάγραμμα διαφορικής παλμικής πολαρογραφίας, προσθήκης γνωστής ποσότητας μετάλλου (C_{Me}). Η καμπύλη (α) αντιστοιχεί σε μηδενική συγκέντρωση υποκαταστατών ($L=0$), η καμπύλη (β) σε μη μηδενική συγκέντρωση υποκαταστατών ($L \neq 0$) και το τμήμα (γ) στην προέκταση του παράλληλου με την ευθεία (α) τμήματος της καμπύλης (β). Το σημείο τομής του τμήματος (γ) με τον άξονα x αντιστοιχεί στην τιμή της προσδιοριζόμενης συμπλεκτικής ικανότητας (CC).



Διάγραμμα 2.2: Καμπύλες τιτλοδότησης δείγματος για pH=2 και pH=8.



Διάγραμμα 2.3: Διάγραμμα Ruzic. Ευθεία καμπύλη του λόγου $M/(M_T-M)$ (του ελεύθερου ιοντικού χαλκού προς το συμπλεγμένο) ως προς M .

2.4 Κυτταρικές Σειρές

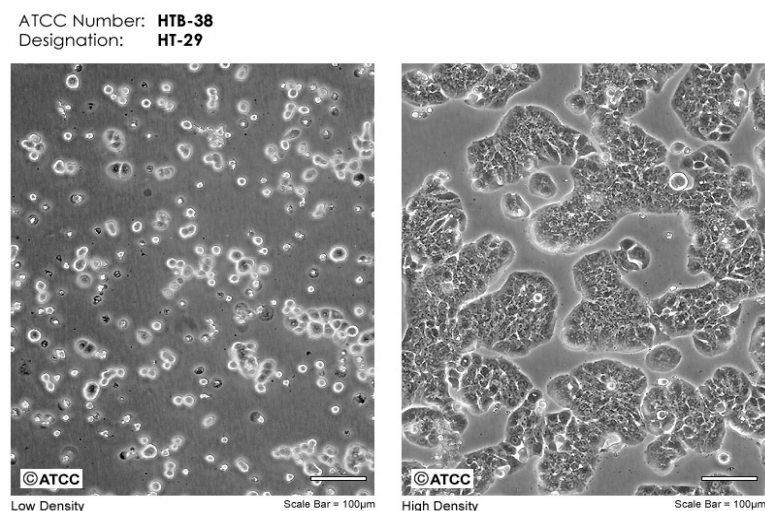
2.4.1 Κυτταρικές Σειρές HT29 και PC3

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία προκειμένου να μελετηθεί η βιολογική επίδραση του αφεψήματος από Μελισσόχορτο ήταν η HT-29 και η PC3.

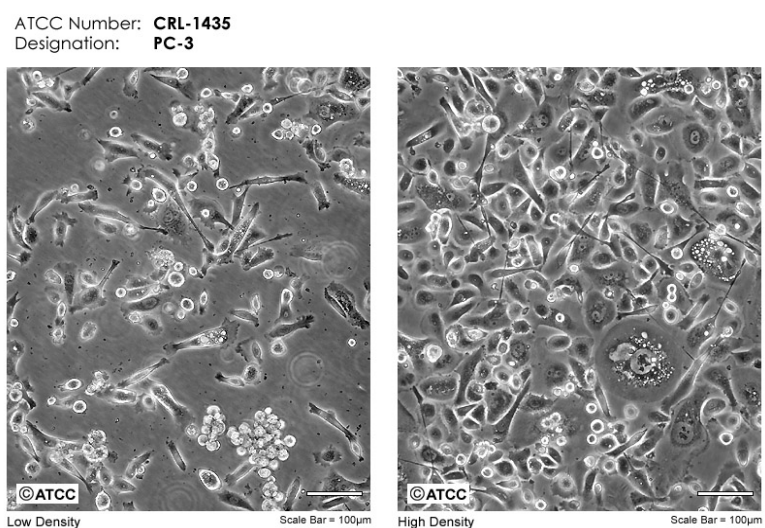
HT-29: Πρόκειται για επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου, τα οποία απομονώθηκαν από όγκο στο κόλον Καυκάσιας γυναίκας ηλικίας 44 ετών.

PC3: Πρόκειται για επιθηλιακά κύτταρα του προστάτη, τα οποία απομονώθηκαν από όγκο στον προστάτη Καυκάσιου ανδρός ηλικίας 62 ετών.

Στις Εικόνες 1 και 2 παρουσιάζονται τα κύτταρα από τις καρκινικές σειρές HT29 και PC3 αντίστοιχα, σε χαμηλή συγκέντρωση (αριστερά) και σε υψηλή συγκέντρωση (δεξιά).



Εικόνα 2.1: Κύτταρα της καρκινικής σειράς HT-29 σε χαμηλή (αριστερά) και σε υψηλή (δεξιά) συγκέντρωση.



Εικόνα 2.2: Κύτταρα της καρκινικής σειράς PC3 σε χαμηλή (αριστερά) και σε υψηλή (δεξιά) συγκέντρωση.

2.4.2 Καλλιέργεια κυττάρων

Η πορεία που ακολουθήθηκε για την καλλιέργεια των κυττάρων, τα αντιδραστήρια και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κοινά για τις δυο υπό μελέτη κυτταρικές σειρές.

Αντιδραστήρια- Όργανα

Βόειος ορός

Καλλιεργητικό υλικό DMEM (4.5g/L D-γλυκόζη, L-γλουταμίνη, Πυροσταφυλικό οξύ)

Πενικιλίνη- Στρεπτομυκίνη (PS)

Αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα PBS 20mM, pH= 7.4

Διάλυμα θρυψίνης

Διάλυμα χρωστικής κυανού του τρυπανίου (Trypan Blue)

Διάλυμα Διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO)

Αποστειρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες (15mL ή 50mL)

Αυτόματες πιπέτες (200-1000μL)

Αποστειρωμένα tips

Φλάσκες καλλιέργειας (15cm² ή 75cm²)

Αποστειρωμένα κρυογονικά φιαλίδια (2mL)

Θάλαμος διπλής κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow) με λάμπες UV

Ερευνητικό μικροσκόπιο φθορισμού

Επωαστικός θάλαμος διοξειδίου (Συνθήκες: 37° C, 5% CO₂, 95% υγρασία)

Ψυγεία, καταψύκτης (-20° C), Υπερκατάψυξη (-80° C), Υγρό άζωτο (-196° C)

Αναλυτική Πορεία

I. Μέτρηση κυττάρων και έλεγχος βιωσιμότητας

Τα κύτταρα μετρώνται με τη χρήση αιμοκυττόμετρου. Στο κυτταρικό εναιώρημα προστίθεται κατάλληλος όγκος από το διάλυμα της χρωστικής κυανού του τρυπανίου (trypan blue) και ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (25° C). Στη συνέχεια, τα κύτταρα μεταφέρονται στο αιμοκυττόμετρο και πραγματοποιείται η μέτρησή τους στο φωτονικό μικροσκόπιο. Γίνεται μέτρηση τόσο των συνολικών κυττάρων όσο και των κυττάρων που έχουν βαφεί κυανά λόγω της εισόδου της χρωστικής. Από τον παρακάτω μαθηματικό τύπο προκύπτει το ποσοστό βιωσιμότητας:

$$\% \text{ Βιώσιμων κυττάρων} = 100 \times \frac{\text{Νεκρά κύτταρα (κυανά)}}{\text{Συνολικά μετρηθέντα κύτταρα}}$$

II. Καλλιέργεια κυττάρων

Τα κύτταρα μεταφέρονται σε φλάσκα καλλιέργειας και διατηρούνται σε θρεπτικό υλικό (Complete medium), το οποίο αποτελείται από 10% βόειο ορό (FBS), 90% καλλιεργητικό υλικό DMEM (4.5g/L D-γλυκόζη, L-γλουταμίνη, πυροσταφυλικό οξύ) και

1% αντιβιοτικό (PS- 100U/mL πενικιλίνη και 100μg/mL στρεπτομυκίνη), σε επωαστικό θάλαμο με συνθήκες 5% CO₂, 37° C και 95% υγρασία. Ως ημέρα ανάπτυξης συνοχής-συρροής των κυττάρων ορίζεται η ημέρα κατά την οποία παρατηρείται σχηματισμός συνεχούς μονόστιβου επιθηλίου, το οποίο καλύπτει την επιφάνεια της φλάσκας καλλιέργειας σε ποσοστό περίπου 80%. Η παρακολούθηση της ανάπτυξης της καλλιέργειας γίνεται με οπτική μικροσκοπία. Σύμφωνα με την εταιρία παροχής των κυτταρικών σειρών, συστήνεται να γίνεται ανανέωση του θρεπτικού υλικού κάθε 2-3 ημέρες προκειμένου να υπάρχει επάρκεια θρεπτικών ουσιών για τα κύτταρα αλλά και προκειμένου να απομακρυνθούν από την καλλιέργεια τοξικά παραπροϊόντα του μεταβολισμού των κυττάρων.

Η καμπύλη ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων, όπως και των υπόλοιπων τύπων κυττάρων, περιλαμβάνει 4 φάσεις: (α) τη *λανθάνουσα φάση* ή *φάση προσαρμογής*, η οποία αφορά στο στάδιο του εμβολιασμού της καλλιέργειας με κύτταρα, (β) την *εκθετική-λογαριθμική φάση*, κατά την οποία τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται με ταχείς ρυθμούς και κατά την οποία συλλέγονται τα κύτταρα για τις διάφορες βιολογικές δοκιμές, (γ) τη *στατική φάση*, κατά την οποία τα κύτταρα δεν πολλαπλασιάζονται περαιτέρω και (δ) τη *φάση θανάτου*. Όπως παρατηρήθηκε από τις καμπύλες ανάπτυξης και των δύο κυτταρικών σειρών, τα κύτταρα διπλασιάζονται σχεδόν σε αριθμό μετά από 48 ώρες επώαση.

Κατά τη διαδικασία της ανακαλλιέργειας (*split*), γίνεται απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού από τη φλάσκα και ακολούθως γίνεται πλύση αυτής με 5mL ρυθμιστικού διαλύματος (PBS) προκειμένου να απομακρυνθούν τα υπολείμματα θρεπτικού υλικού. Το στάδιο αυτό είναι πολύ σημαντικό καθώς ο ορός αναστέλλει τη δράση της θρυψίνης που προστίθεται παρακάτω. Μετά την πλύση με το ρυθμιστικό διάλυμα, προστίθενται 3mL διαλύματος θρυψίνης- EDTA και η φλάσκα μεταφέρεται για επώαση για 7 λεπτά στον επωαστικό θάλαμο προκειμένου να αποκολληθεί το μονόστιβο επιθήλιο που έχουν σχηματίσει τα κύτταρα. Στη συνέχεια, τα κύτταρα που συλλέγονται από τη φλάσκα μεταφέρονται σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα (15mL), ο οποίος περιέχει κατάλληλο όγκο θρεπτικού υλικού (συνήθως 5-6mL) και φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά στα 1800rpm και σε θερμοκρασία 20° C έτσι ώστε να απομακρυνθεί το διάλυμα θρυψίνης-EDTA. Η διαδικασία της πλύσης των κυττάρων μέσω της φυγοκέντρωσης επαναλαμβάνεται εις διπλούν. Έπειτα τα κύτταρα επαναδιαλυτοποιούνται σε κατάλληλο όγκο θρεπτικού υλικού (ανάλογα με τον όγκο του ιζήματος των κυττάρων που προκύπτει

από τη φυγοκέντρωση). Για την καρκινική σειρά HT29, ο διαχωρισμός των κυττάρων σε φλάσκες είναι 1/3-1/8 ενώ για την καρκινική σειρά PC3 είναι 1/3-1/6.

III. Ψύξη και απόψυξη κυττάρων

Στην περίπτωση που τα κύτταρα, τα οποία έχουν συλλεγεί από καλλιέργεια κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης και τα οποία έχουν μετρηθεί σε αιμοκυττόμετρο, δεν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν άμεσα για κάποια βιολογική δοκιμή, επαναλαμβάνεται η διαδικασία της φυγοκέντρωσης που περιγράφηκε παραπάνω (5min- 1800rpm-20° C) και γίνεται *ψύξη/ αποθήκευση* των κυττάρων. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και γίνεται διάσπαση του κυτταρικού ιζήματος. Ακολούθως, γίνεται επαναιώρηση του ιζήματος με την προσθήκη διαλύματος ψύξης (Freeze medium), το οποίο αποτελείται από 20% βόειο ορό (FBS), 10% DMSO και 70% θρεπτικού υλικού (Complete medium). Ανάλογα με τον αριθμό κυττάρων που έχουν προκύψει από τη μέτρηση, γίνεται προσθήκη κατάλληλου όγκου διαλύματος ψύξης. Η πυκνότητα των κυττάρων ρυθμίζεται στα 5×10^6 / mL διαλύματος ψύξης. Στη συνέχεια, μεταφέρεται 1mL απο το κυτταρικό εναιώρημα σε κρυογονικά φιαλίδια (cryovials) χωρητικότητας 2mL, τα οποία τοποθετούνται αρχικά σε κουτί ισοπροπανόλης στους -80° C και ακολούθως μεταφέρονται σε δοχείο με υγρό άζωτο στους -196° C (διαδοχική- σταδιακή ψύξη), όπου και αποθηκεύονται.

Κατά την *απόψυξη* των κυττάρων, τα κρυογονικά φιαλίδια που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν φέρονται από το δοχείο υγρού αζώτου σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 37° C. Μόλις παρατηρηθεί υγροποίηση του περιεχομένου του κρυογονικού φιαλιδίου, γίνεται αραίωση αυτού περίπου 10 φορές με θρεπτικό υλικό, το οποίο βρίσκεται επίσης σε θερμοκρασία 37° C, και πραγματοποιείται φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στα 1800rpm στους 20° C. Γίνεται απόρριψη του υπερκειμένου και η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλη μια φορά. Το κυτταρικό ίζημα που προκύπτει από τη φυγοκέντρωση επαναιωρείται σε κατάλληλο όγκο θρεπτικού υλικού (συνήθως 5mL) και μοιράζεται σε φλάσκες καλλιέργειας, οι οποίες μεταφέρονται στον επωαστικό θάλαμο.

2.5 Μέθοδοι εκτίμησης της βιολογικής δράσης του αφεψήματος

2.5.1 Διαλυτοποίηση στερεού υπολείμματος αφεψήματος

Αντιδραστήρια- Όργανα

Καλλιεργητικό υλικό DMEM (4.5g/L D-γλυκόζη, L-γλουταμίνη, Πυροσταφυλικό οξύ)

Αυτόματες πιπέτες 100-1000μL και tips

Αποστειρωμένες σύριγγες (5mL)
Αποστειρωμένα φίλτρα (0.20μm)
Αποστειρωμένα φιαλίδια erpendorf (1.5mL)
Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων
Πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες (5mL)
Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow) με λάμπες UV
Καταψύκτης -20°C

Αναλυτική Πορεία

Αρχικά, το δείγμα του αφυδατωμένου αφεψήματος αποψύχεται σε σκοτεινό μέρος και παράλληλα φέρεται σε θερμοκρασία δωματίου και το καλλιεργητικό υλικό. Σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας ζυγίζονται 150-220mg από το δείγμα και, στη συνέχεια, με βάση τη ζυγισθείσα ποσότητα αφυδατωμένου αφεψήματος προστίθεται κατάλληλος όγκος καλλιεργητικού υλικού ώστε η τελική συγκέντρωση του πυκνού διαλύματος να είναι 200μg/mL. Έπειτα, ο δοκιμαστικός σωλήνας μεταφέρεται στη συσκευή Elmasonic S60 για 5 λεπτά όπου πραγματοποιείται ανάδευση, προκειμένου να επιτευχθεί καλύτερη διαλυτοποίηση. Ακολούθως, λαμβάνεται το περιεχόμενο του δοκιμαστικού σωλήνα με αποστειρωμένη σύριγγα (5mL), διέρχεται μέσω αποστειρωμένου πλαστικού φίλτρου με διάμετρο πόρων 0.20μm, συλλέγεται σε αποστειρωμένο φιαλίδιο erpendorf (1.5mL) και αποθηκεύεται στους -20°C.

2.5.2 Έλεγχος του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη μέθοδο MTT

Επίδραση στα κύτταρα με το διάλυμα του αφεψήματος

Αντιδραστήρια- Όργανα

Πολυστυρενικά τρυβλία 96 βοθρίων (96-well plate)
Βόειος ορός (FBS)
Καλλιεργητικό υλικό DMEM (4.5g/L D-γλυκόζη, L-γλουταμίνη, Πυροσταφυλικό οξύ)
Πενικιλίνη- Στρεπτομυκίνη (PS)
Αποστειρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες χωρητικότητας 15mL ή 50mL (falcon tubes)
Αυτόματες πιπέτες (2-1000μL)
Αποστειρωμένα tips
Διάλυμα MTT (3-4,5- dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
συγκέντρωσης 5mg/mL

Διάλυμα Διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO)

Θάλαμος διπλής κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow) με λάμπες UV

Επώαστικός θάλαμος (37° C, 5% CO₂, 95% υγρασία)

Φωτόμετρο ELISA (ELISA reader)

Αρχή της Μεθόδου

Η μέθοδος MTT βασίζεται στην ικανότητα του μιτοχονδριακού ενζύμου γαλακτική αφυδρογονάση (LDH) των ζωντανών μόνο κυττάρων να διασπά τους δακτυλίους τετραζολίου της κίτρινης χρωστικής MTT οδηγώντας στο σχηματισμό κρυστάλλων πορφυρού (μωβ) χρώματος. Οι κρύσταλλοι αυτοί έχουν την ικανότητα να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες, με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται στον ενδοκυττάριο χώρο των ζωντανών κυττάρων. Η προσθήκη του διαλύματος διμεθυλοδουλφοξειδίου (DMSO) επάγει λύση των κυττάρων και απελευθέρωση των κρυστάλλων και ο αριθμός τους είναι ανάλογος του αριθμού των ζωντανών κυττάρων.

Αναλυτική Πορεία

Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία μέτρησης των κυττάρων με τον τρόπο που περιγράφηκε στην παράγραφο 2.4.2, τα κύτταρα μοιράζονται σύμφωνα με το σχεδιασμό της πειραματικής διαδικασίας σε εξειδικευμένα πολυστυρενικά τρυβλία των 96 βοθρίων. Πιο συγκεκριμένα, για την κυτταρική σειρά HT29 μεταφέρεται τόσος όγκος από το εναιώρημα των κυττάρων (σε θρεπτικό υλικό) έτσι ώστε η πυκνότητά τους να είναι 5×10^3 κύτταρα/βοθρίο ενώ για την κυτταρική σειρά PC3 η πυκνότητα των κυττάρων ορίζεται να είναι 3×10^3 κύτταρα/βοθρίο. Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη θρεπτικού υλικού έτσι ώστε ο τελικός όγκος σε κάθε βοθρίο να είναι 200μL και τα πολυστυρενικά τρυβλία με τα κύτταρα μεταφέρονται για επώαση στον επώαστικό θάλαμο για 24 ώρες (37° C, 5% CO₂, 95% υγρασία) έτσι ώστε να επιτευχθεί η προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια των βοθρίων. Μετά το πέρας των 24 ωρών, γίνεται επίδραση με το διάλυμα του αφυδατωμένου αφεψήματος σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις (1μg/μL, 0.6μg/μL και 0.2μg/μL). Η επίδραση του διαλύματος του αφυδατωμένου αφεψήματος στις 2 κυτταρικές σειρές μελετάται για 24, 48 και 72 ώρες επώαση με αυτό (37° C, 5% CO₂, 95% υγρασία).

Η μελέτη της επίδρασης του αφυδατωμένου αφεψήματος στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό γίνεται μέσω της χρωματομετρικής φωτομετρικής μεθόδου με τη χρήση της χρωστικής MTT. Αρχικά, παρασκευάζεται το διάλυμα της κίτρινης χρωστικής MTT (συγκέντρωση: 5mg/mL) με τη χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος PBS. Στα κύτταρα που

έχει γίνει επίδραση με το διάλυμα του αφυδατωμένου αφεψήματος γίνεται προσθήκη 20μL διαλύματος της χρωστικής MTT. Ακολουθεί επώαση για 4 ώρες στον επωαστικό θάλαμο (37° C, 5% CO₂, 95% υγρασία), απομάκρυνση του υπερκειμένου και προσθήκη 200μL διαλύματος DMSO. Οι κρύσταλλοι που δημιουργούνται, διαλυτοποιούνται με την αυτόματη πιπέτα και τα κύτταρα που υπάρχουν στο πολυστυρενικό τρυβλίο επωάζονται για 5 λεπτά ακόμα. Τέλος, γίνεται μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (απορρόφησης) σε φωτόμετρο ELISA σε μήκος κύματος 550nm.

2.5.3 Μέτρηση των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH)

Επίδραση στα κύτταρα με το διάλυμα του αφεψήματος

Αντιδραστήρια- Όργανα

Φλάσκες καλλιέργειας (75cm²)

Βόειος ορός (FBS)

Καλλιεργητικό υλικό DMEM (4.5g/L D-γλυκόζη, L-γλουταμίνη, Πυροσταφυλικό οξύ)

Πενικιλίνη- Στρεπτομυκίνη (PS)

Αποστειρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες (15mL ή 50mL, falcon tubes)

Αυτόματες πιπέτες (2-1000μL)

Αποστειρωμένα tips

Διάλυμα μεταφωσφορικού οξέος 5%

Πολυστυρενικά τρυβλία 96 βοθρίων (96-well plate)

Εξειδικευμένο kit για τη μέτρηση της γλουταθειόνης (GSH)

Θάλαμος διπλής κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow) με λάμπες UV

Επωαστικός θάλαμος (37° C, 5% CO₂, 95% υγρασία)

Φωτόμετρο ELISA (ELISA reader)

Αρχή της Μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στο σχηματισμό έγχρωμης ένωσης θειόνης, η συγκέντρωση της οποίας είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της γλουταθειόνης και η οποία απορροφά στα 400nm. Αρχικά, γίνεται προσθήκη της έγχρωμης ένωσης 4-chloro-1- methyl- 7-trifluoromethylquinolinium methylsulfate (χρωμογόνο) η οποία σχηματίζει θειοαιθέρες με όλες τις θειόλες που είναι παρούσες στο δείγμα και, στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη βάσης προκειμένου να αυξηθεί το pH πάνω από 13 (> 13.4). Σε αυτό το pH, οι θειοαιθέρες της γλουταθειόνης μετατρέπονται σε θειόνη.

Αναλυτική Πορεία

Με τον τρόπο που περιγράφηκε στην παράγραφο 2.4.2, τα κύτταρα μετρώνται και μοιράζονται σύμφωνα με το σχεδιασμό του πειράματος σε φλάσκες καλλιέργειας. Και για τις δυο κυτταρικές σειρές, HT29 και PC3, μεταφέρεται τόσος όγκος από το εναιώρημα των κυττάρων (σε θρεπτικό υλικό) έτσι ώστε η πυκνότητά τους να είναι 2.5×10^6 κύτταρα/βοθρίο. Στη συνέχεια, προστίθεται σε κάθε φλάσκα κατάλληλος όγκος θρεπτικού υλικού ώστε ο τελικός συνολικός όγκος να είναι 15mL. Έπειτα, οι φλάσκες μεταφέρονται για επώαση στον επωαστικό θάλαμο (37°C , 5% CO_2 , 95% υγρασία) για 24 ώρες προκειμένου τα κύτταρα να προσκολληθούν στην επιφάνεια των φλασκών. Αφού παρέλθουν οι 24 ώρες, γίνεται επίδραση στις καλλιέργειες με το διάλυμα του αφυδατωμένου αφεψήματος. Ειδικότερα, προστίθεται κατάλληλος όγκος από το πυκνό διάλυμα ($200 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) του αφυδατωμένου αφεψήματος ώστε η τελική συγκέντρωση του βοτάνου στη φλάσκα να είναι $0.2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ και τα κύτταρα συλλέγονται μετά από 24 ώρες επώαση με αυτό.

Για τη μέτρηση των ενδοκυττάρων επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH), πραγματοποιείται εκχύλιση των κυττάρων με μεταφωσφορικό οξύ (0.5mL) και γίνεται προσδιορισμός της γλουταθειόνης στο εκχύλισμα με την εφαρμογή εξειδικευμένου kit με την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς για την GSH και τη χρήση φωτομετρικής μεθόδου σύμφωνα με τις οδηγίες της παρασκευάστριας εταιρίας. Συγκεκριμένα, γίνεται προσθήκη $75 \mu\text{L}$ δείγματος ή διαλύματος standard σε εξειδικευμένα πολυστυρενικά τρυβλία των 96 βοθρίων και, στη συνέχεια, προστίθενται $50 \mu\text{L}$ χρωμογόνου και $50 \mu\text{L}$ βασικού διαλύματος. Ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά σε συνθήκες σκότους και σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα γίνεται μέτρηση με τη χρήση φωτόμετρου ELISA στα 400nm. Για την έκφραση των αποτελεσμάτων κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

Κατασκευή Πρότυπης καμπύλης αναφοράς για τη γλουταθειόνη (GSH)

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιείται μητρικό διάλυμα γλουταθειόνης (GSH) $150 \mu\text{M}$ και $175 \mu\text{M}$ και ακολουθείται η διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω. Οι μετρήσεις που προκύπτουν χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος $y = f(x)$, όπου ο άξονας x εκφράζει τη συγκέντρωση της γλουταθειόνης (GSH) σε μM και ο άξονας y εκφράζει την απορρόφηση στα 400nm.

2.5.4 Μέτρηση των επιπέδων της ιντερλευκίνης 8 (IL-8)

Επίδραση στα κύτταρα με το διάλυμα του αφεψήματος

Αντιδραστήρια- Όργανα

Βόειος ορός (FBS)

Καλλιεργητικό υλικό DMEM (4.5g/L D-γλυκόζη, L-γλουταμίνη, Πυροσταφυλικό οξύ)

Πενικιλίνη- Στρεπτομυκίνη (PS)

Αποστειρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες χωρητικότητας 15mL ή 50mL (falcon tubes)

Αυτόματες πιπέτες (2-1000μL)

Αποστειρωμένα tips

Πολυστυρενικά τρυβλία 12 βοθρίων (12-well plate)

Θάλαμος διπλής κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow) με λάμπες UV

Επωαστικός θάλαμος (37° C, 5% CO₂, 95% υγρασία)

Αναλυτική Πορεία

Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία μέτρησης των κυττάρων με τον τρόπο που περιγράφηκε στην παράγραφο 2.4.2, τα κύτταρα μοιράζονται σύμφωνα με το σχεδιασμό της πειραματικής διαδικασίας σε εξειδικευμένα πολυστυρενικά τρυβλία των 12 βοθρίων. Και για τις δυο κυτταρικές σειρές, HT29 και PC3, μεταφέρεται τόσος όγκος από το εναιώρημα των κυττάρων (σε θρεπτικό υλικό) έτσι ώστε η πυκνότητά τους να είναι 10⁵ κύτταρα/ βοθρίο. Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη θρεπτικού υλικού έτσι ώστε ο τελικός όγκος σε κάθε βοθρίο να είναι 2mL και τα πολυστυρενικά τρυβλία με τα κύτταρα μεταφέρονται για επώαση στον επωαστικό θάλαμο για 24 ώρες (37° C, 5% CO₂, 95% υγρασία) έτσι ώστε να επιτευχθεί η προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια των βοθρίων. Μετά το τέλος των 24 ωρών ανανεώνεται το θρεπτικό υλικό στα βοθρία και γίνεται επίδραση με το διάλυμα του αφυδατωμένου αφεψήματος. Πιο συγκεκριμένα, προστίθενται 2μL από το πυκνό διάλυμα του αφυδατωμένου αφεψήματος (200μg/μL). Η επώαση των κυττάρων μετά την επίδραση με το διάλυμα του στερεού υπολείμματος του αφεψήματος γίνεται για 24 και για 48 ώρες (37° C, 5% CO₂, 95% υγρασία). Στη συνέχεια, το υπερκείμενο απορρίπτεται, το θρεπτικό υλικό ανανεώνεται έτσι ώστε ο τελικός όγκος σε κάθε βοθρίο να είναι 1mL και τα κύτταρα διεγείρονται με την προσθήκη 2.5μL TNF-α συγκέντρωσης 50ng/mL για 24 ώρες.

Διέγερση των κυττάρων με τον παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF-α)

Στις καλλιέργειες των κυττάρων των καρκινικών σειρών HT29 και PC3, επομένως, γίνεται επίδραση με τον προφλεγμονώδη παράγοντα TNF-α, το διάλυμα του οποίου έχει συγκέντρωση 50ng/mL, αφού έχει προηγηθεί η επώαση με το διάλυμα του αφυδατωμένου αφεψήματος. Η επιτυχία του μοντέλου φλεγμονής ελέγχεται με διέγερση κυττάρων (και των δυο κυτταρικών σειρών) με ίση συγκέντρωση TNF-α στα οποία δεν έχει γίνει επίδραση με το αφέψημα του μελισσόχορτου συγκριτικά με μη διεγερμένα κύτταρα. Έπειτα από 24 ώρες επώαση (37° C, 5% CO₂, 95% υγρασία) με τον TNF-α, το υπερκείμενο των βοθρίων συλλέγεται σε φιαλίδια erppendorfs (1.5mL) και είτε αποθηκεύεται στους -80° C είτε χρησιμοποιείται άμεσα για τη μέτρηση των επιπέδων της ιντερλευκίνης 8 (IL-8) αφού προηγηθεί φυγοκέντρηση και συλλογή του υπερκειμένου (το ίζημα που προκύπτει αποτελεί τα νεκρά κύτταρα). Παράλληλα, γίνεται και η συλλογή των κυττάρων που έχουν σχηματίσει το μονόστιβο επιθήλιο στην επιφάνεια των βοθρίων προκειμένου να μετρηθεί η ένταση ενεργοποίησης της πρωτεΐνης NF-κΒ p65.

Αντιδραστήρια- Όργανα

Απιονισμένο νερό

Αυτόματες πιπέτες (2-1000μL)

Πολυκάναλη πιπέτα

Tips

Φιαλίδια erppendorfs (1.5mL)

Εξειδικευμένο ELISA kit για την IL-8

Φωτόμετρο ELISA (ELISA reader)

Αρχή της Μεθόδου

Η ιντερλευκίνη 8 (IL-8) προσδένεται αρχικά σε μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για την IL-8 (anti-IL-8), το οποίο υπάρχει ήδη επιστρωμένο στα ειδικά βοθρία, ενώ στη συνέχεια για τον ανοσοπροσδιορισμό προστίθεται ειδικό για την IL-8 πολυκλωνικό αντίσωμα ανιχνευτής της προσδεδεμένης IL-8 στο μονοκλωνικό αντίσωμα, το οποίο είναι συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση. Μετά από πλύσιμο για την απομάκρυνση άλλων μη συζευγμένων πρωτεϊνών, προστίθεται υπόστρωμα προκειμένου να αντιδράσει το ένζυμο υπεροξειδάση και λαμβάνει χώρα χρωματομετρική αντίδραση. Το προϊόν της αντίδρασης αναπτύσσει χρώμα ανάλογα με την ποσότητα της IL-8 που έχει προσκολληθεί/ προσδεθεί στο αρχικό αντίσωμα και απορροφά στα 450nm.

Αναλυτική Πορεία

Για τη μέτρηση των επιπέδων της ιντερλευκίνης 8 (IL-8) χρησιμοποιείται εξειδικευμένο sandwich kit και ακολουθείται το πρωτόκολλο που παρέχει η κατασκευάστρια εταιρία. Τα επίπεδα της ιντερλευκίνης στο υπερκείμενο της καλλιέργειας μετρώνται σε φωτόμετρο ELISA. Σε πρώτο στάδιο, όλα τα αντιδραστήρια, τα δείγματα και τα standards φέρονται σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως, αυτά προετοιμάζονται σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτοκόλλου που ακολουθείται. Σε όλα τα control και τα δείγματα πραγματοποιείται αραιώση 1:10 με το ήδη αραιωμένο (1:5) αντιδραστήριο Calibrator Diluent RD5P. Στα βοηθία (wells) του τρυβλίου επώασης (plate) προστίθενται, αρχικά, 100μL από το αντιδραστήριο Assay Diluent (RD1-85) και, στη συνέχεια, 50μL από το αραιωμένο standard, control ή δείγμα. Το τρυβλίο επώασης καλύπτεται με ειδική ταινία και ακολουθεί επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας των 2 ωρών, το υπερκείμενο απομακρύνεται και γίνεται πλύση των βοηθίων 4 φορές με 400μL αραιωμένου διαλύματος πλύσης (Wash buffer) κάθε φορά με τη χρήση πολυκάναλης πιπέτας. Μετά το τελευταίο πλύσιμο απομακρύνεται κάθε ίχνος υγρασίας και προστίθενται 100μL πολυκλωνικού αντισώματος (αντιδραστήριο Human IL-8 Conjugate) σε κάθε βοηθίο. Το τρυβλίο επώασης καλύπτεται ξανά με ειδική ταινία και αφήνεται για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Μετά το τέλος της επώασης, το υπερκείμενο απομακρύνεται και επαναλαμβάνεται η πλύση των βοηθίων 4 φορές, με τον τρόπο που περιγράφηκε προηγουμένως. Απομακρύνεται η υγρασία, προστίθενται 200μL υποστρώματος (αντιδραστήριο Substrate Solution = Color Reagent A + Color Reagent B (1:1)) και γίνεται επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και σε συνθήκες σκότους. Αφού περάσουν τα 30 λεπτά, προστίθενται 50μL διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης (αντιδραστήριο Stop Solution) και γίνεται μέτρηση της απορρόφησης σε φωτόμετρο ELISA στα 450nm. Προκειμένου τα αποτελέσματα να εκφραστούν σε pg/mL, όπως συστήνεται από την κατασκευάστρια εταιρία, κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς για την ιντερλευκίνη 8 (IL-8) με τη χρήση του διαλύματος standard και την πραγματοποίηση διαδοχικών αραιώσεων.

Κατασκευή Πρότυπης καμπύλης αναφοράς για την ιντερλευκίνη 8 (IL-8)

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, γίνεται διαλυτοποίηση του μητρικού διαλύματος της ιντερλευκίνης 8 (Human IL-8 Standard) με ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα (Calibrator Diluent RD5P) και προκύπτει διάλυμα συγκέντρωσης 2000pg/mL (διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης). Έπειτα από διαδοχικές αραιώσεις, προκύπτουν διαλύματα με

τελικές συγκεντρώσεις 1000, 500, 250, 125, 62.5 και 31.3pg/mL ενώ ως διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης (0pg/mL) θεωρείται το διάλυμα Calibrator Diluent RD5P. Ακολουθείται το πρωτόκολλο που περιγράφηκε παραπάνω και οι μετρήσεις που προκύπτουν χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος της μορφής $y = f(x)$, όπου οι τιμές στον άξονα y εκφράζουν τις τιμές της απορρόφησης στα 450nm και οι τιμές στον άξονα x εκφράζουν τις διαφορετικές συγκεντρώσεις των διαλυμάτων της ιντερλευκίνης 8 (IL-8).

2.5.5 Μέτρηση του μεταγραφικού Πυρηνικού παράγοντα-κB p65 (NF-κB)

Αντιδραστήρια- Όργανα

Υπερκάθαρο νερό

Παγωμένο Ρυθμιστικό διάλυμα PBS (20mM, pH 7.4)

Φαινυλ-μεθυλ-σουλφονυλο-φθορίδιο (Phenylmethylsulfonyl-fluoride, PMSF 1mM)

Διάλυμα λύσης των κυττάρων ειδικό για τον NF-κB (φυλάσσεται στους -20° C)

Αυτόματες πιπέτες (2-1000μL)

Πολυκάναλη πιπέτα

Tips

Scrapers

Parafilm

Φιαλίδια erpendorfs (1.5mL)

Δοκιμαστικοί σωλήνες (15mL και 50mL, falcon tubes)

Θρυμματισμένος πάγος

Πολυστυρενικό τρυβλίο 96 βοθρίων (96-well plate)

Εξειδικευμένο ELISA kit για τον NF-κB

Συσκευή υπερήχων (Sonicator Elmasonic S60)

Φυγόκεντρος

Φωτόμετρο ELISA (ELISA reader)

Αρχή της Μεθόδου

Η αρχή της μεθόδου είναι όμοια με αυτήν που περιγράφεται στην ενότητα 2.5.4 για την ιντερλευκίνη-8.

Αναλυτική Πορεία

Λύση κυττάρων

Μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου από τα πολυστυρενικά τρυβλία των 12 βοθρίων για τη μέτρηση των επιπέδων της ιντερλευκίνης 8 (IL-8), όπως περιγράφηκε στην υποενότητα 2.5.4, προστίθεται στα βοθρία 0.5mL παγωμένου διαλύματος PBS. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και η διαδικασία επαναλαμβάνεται εις διπλούν. Στη συνέχεια, και ενώ η προετοιμασία πραγματοποιείται σε δοχείο που περιέχει θρυμματισμένο πάγο, προστίθενται 150μL διαλύματος λύσης των κυττάρων (cell lysis buffer). Πιο συγκεκριμένα, το διάλυμα λύσης των κυττάρων παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση του αντιδραστηρίου phenylmethylsulfonyl-fluoride (PMSF) 1mM (ζυγίζονται 9mg) από 5mL διαλύματος λύσης για τον NF-κΒ και, στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη 45mL Milli-Q H₂O (παρασκευή 50mL διαλύματος λύσης). Τα κύτταρα αφήνονται στον πάγο για επώαση για 5 λεπτά. Έπειτα, τα κύτταρα με τη βοήθεια scraper αποκολλώνται από τα βοθρία και μεταφέρονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες καλύπτονται με parafilm και μεταφέρονται σε συσκευή υπερήχων για 10 λεπτά προκειμένου να επιτευχθεί αποτελεσματικότερη λύση. Ακολούθως, το περιεχόμενο των δοκιμαστικών σωλήνων φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στα 10000g στους 4° C. Το υπερκείμενο διάλυμα που περιέχει τις πρωτεΐνες συλλέγεται, μεταφέρεται σε φιαλίδια erppendorfs και αποθηκεύεται στους -80° C.

Ενεργοποίηση NF-κΒ

Για την αξιολόγηση της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ, μετρώνται τα επίπεδα της πρόδρομης πρωτεΐνης (NF-κΒ) p65, που αποτελεί υπομονάδα του. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης (NF-κΒ) p65 μετρώνται σε φωτόμετρο ELISA με την εφαρμογή εξειδικευμένου sandwich kit σύμφωνα με το πρωτόκολλο που συστήνεται από την κατασκευάστρια εταιρία. Σε πρώτο στάδιο, όλα τα αντιδραστήρια, τα δείγματα και τα standards φέρονται σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως, αυτά προετοιμάζονται σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτοκόλλου. Σε όλα τα control και τα δείγματα πραγματοποιείται αραιώση 1:1 με το αντιδραστήριο Sample Diluent. Στα βοθρία (wells) του τρυβλίου επώασης (plate), όπου υπάρχει ήδη επιστρωμένο το ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα, προστίθενται, αρχικά, 100μL από το αραιωμένο control ή δείγμα. Το τρυβλίο επώασης καλύπτεται με ειδική ταινία και αφήνεται για επώαση για 12 ώρες (overnight) στους 4° C ή για 2 ώρες στους 37° C. Μετά το πέρας των 12 ωρών, το υπερκείμενο απομακρύνεται και ακολουθεί πλύση με 200μL αραιωμένου διαλύματος πλύσης (wash

buffer). Η διαδικασία πλύσης επαναλαμβάνεται συνολικά 4 φορές. με τη χρήση πολυκάναλης πιπέτας. Μετά το τελευταίο πλύσιμο απομακρύνεται κάθε ίχνος υγρασίας και, έπειτα, προστίθενται στα βοθρία του τρυβλίου 100μL από το διάλυμα του πολυκλωνικού αντισώματος και το τρυβλίο αφήνεται για επώαση για 1 ώρα στους 37° C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται ξανά και επαναλαμβάνεται η διαδικασία πλύσης όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Προστίθενται, στη συνέχεια, 100μL από το διάλυμα του ενζύμου Streptavidin-HRP και ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά στους 37° C. Γι ακόμη μια φορά, το υπερκείμενο απομακρύνεται, ακολουθεί πλύση και απομάκρυνση της υγρασίας από τα βοθρία και προσθήκη 100μL από το διάλυμα του υποστρώματος (TMB substrate). Το τρυβλίο αφήνεται για επώαση για 10 λεπτά στους 37° C ή για 30 λεπτά στους 25° C. Τέλος, προστίθενται 100μL από το διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης και γίνεται μέτρηση της απορρόφησης στα 450nm σε φωτόμετρο ELISA.

2.5.6 Μελέτη της επίδρασης του αφυδατωμένου αφεψήματος στον κυτταρικό θάνατο- απόπτωση με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής (Flow Cytometry, FACS)

Επίδραση στα κύτταρα με το διάλυμα του αφεψήματος

Αντιδραστήρια- Όργανα

Βόειος ορός (FBS)

Καλλιεργητικό υλικό DMEM (4.5g/L D-γλυκόζη, L-γλουταμίνη, Πυροσταφυλικό οξύ)

Πενικιλίνη- Στρεπτομυκίνη (PS)

Ρυθμιστικό διάλυμα PBS (20mM, pH 7.4)

Διάλυμα θρυψίνης

Παγωμένα καθαρή αιθανόλη (98,9%)

Αποστειρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες χωρητικότητας 15mL ή 50mL (falcon tubes)

Αυτόματες πιπέτες (2-1000μL)

Αποστειρωμένα tips

Εξειδικευμένα πολυστυρενικά τρυβλία 6 βοθρίων (6-well plate)

Θάλαμος διπλής κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow) με λάμπες UV

Φυγόκεντρος

Επωαστικός θάλαμος (37° C, 5% CO₂, 95% υγρασία)

Συσκευή ανάδευσης (Vortex)

Αναλυτική Πορεία

Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία μέτρησης των κυττάρων με τον τρόπο που περιγράφηκε στην παράγραφο 2.4.2, τα κύτταρα μοιράζονται σύμφωνα με το σχεδιασμό της πειραματικής διαδικασίας σε εξειδικευμένα πολυστυρενικά τρυβλία των 6 βοθρίων (6-well plate). Και για τις δυο κυτταρικές σειρές, HT29 και PC3, μεταφέρεται τόσος όγκος από το εναιώρημα των κυττάρων (σε θρεπτικό υλικό) έτσι ώστε η πυκνότητά τους να είναι 0.5×10^6 κύτταρα/ βοθρίο. Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη θρεπτικού υλικού έτσι ώστε ο τελικός όγκος σε κάθε βοθρίο του τρυβλίου να είναι 3mL και, ακολούθως, τα τρυβλία με τα κύτταρα μεταφέρονται για επώαση στον επωαστικό θάλαμο για 24 ώρες (37° C, 5% CO₂, 95% υγρασία) έτσι ώστε να επιτευχθεί η προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια των βοθρίων. Μετά το τέλος των 24 ωρών ανανεώνεται το θρεπτικό υλικό και γίνεται επίδραση με το διάλυμα του αφυδατωμένου αφεψήματος. Η επίδραση του διαλυτοποιημένου αφεψήματος μελετήθηκε μετά από 24, 48 και 72 ώρες επώαση με το αφέψημα και για τις τρεις συγκεντρώσεις που μελετώνται (0.2, 0.6 και 1μg/μL).

Μετά το πέρας κάθε 24ώρου, ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία. Αρχικά, συλλέγεται το υπερκείμενο από κάθε βοθρίο και μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα των 15mL (falcon tube). Στη συνέχεια, τα βοθρία ξεπλένονται με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος PBS (500μL/ βοθρίο) και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Ακολουθεί προσθήκη 500μL τρυψίνης σε κάθε βοθρίο και επώαση για 5-7λεπτά στον επωαστικό θάλαμο (37°C, 5% CO₂, 95% υγρασία) προκειμένου να αποκολληθούν τα κύτταρα από την επιφάνεια των βοθρίων. Με τη χρήση πιπέτας επιτυγχάνεται η παραλαβή του υπερκειμένου που αποτελείται από κύτταρα και θρυψίνη. Τα βοθρία ξεπλένονται με 1mL θρεπτικού υλικού που παραλαμβάνεται από τους αντίστοιχους δοκιμαστικούς σωλήνες που χρησιμοποιήθηκαν σε προηγούμενο στάδιο. Το υπερκείμενο μεταφέρεται και πάλι στους δοκιμαστικούς σωλήνες. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 1000rpm και σε θερμοκρασία 25° C. Αφού ολοκληρωθεί η φυγοκέντρηση γίνεται απόρριψη του υπερκειμένου, προστίθεται 1mL ρυθμιστικού διαλύματος PBS σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα και αναδιάλυση/ επαναιώρηση των κυττάρων. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες μεταφέρονται και πάλι στη φυγόκεντρο για 5 λεπτά στις ίδιες συνθήκες που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Έπειτα, το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθεται ξανά 1mL διαλύματος PBS/ δοκιμαστικό σωλήνα. Με τη χρήση πιπέτας το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται και, στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη στάγδην 1mL παγωμένης καθαρής αιθανόλης (-20°C) σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα κατά τη διάρκεια που γίνεται ανάδευση

του περιεχομένου τους στο vortex. Τέλος, οι δοκιμαστικοί σωλήνες μεταφέρονται στους 4°C και αποθηκεύονται για χρονικό διάστημα μέχρι 1 μήνα.

Αντιδραστήρια- Όργανα

Συσκευή κυτταρομετρίας ροής, η οποία αποτελείται από 5 κύρια μέρη:

- + Ροή υγρού περιβλήματος (sheath fluid) η οποία μεταφέρει και διευθετεί τα κύτταρα έτσι ώστε να περνούν ένα-ένα από τη δέσμη του φωτός λέιζερ
- + Οπτικό σύστημα που παράγει φωτεινά σήματα
- + Έναν ανιχνευτή και ένα σύστημα τροποποίησης σήματος από αναλογικό σε ψηφιακό (Analog to Digital Conversion-ADC)- το οποίο μετατρέπει σήματα πρόσθιας (FSC) και πλάγιας (SSC) σκέδασης καθώς και σήματα φθορισμού από το φως σε ηλεκτρικά σήματα τα οποία μπορούν να επεξεργαστούν από τον Η/Υ
- + Σύστημα ενίσχυσης, το οποίο παρέχει τη δυνατότητα γραμμικής ή λογαριθμικής απεικόνισης και

+ Η/Υ για την ανάλυση των σημάτων

Φυγόκεντρος

Διάλυμα χρώσης του DNA των κυττάρων

Για την παρασκευή του διαλύματος χρώσης του DNA των κυττάρων:

PI (4mg/mL σε DMSO)

Tris.HCl (1M, pH 7.5)

Χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl₂, 1M)

RNAse A (10mg/mL)

Οι αναλυτικοί όγκοι που χρησιμοποιούνται από κάθε αντιδραστήριο καθώς και οι τελικές συγκεντρώσεις των χρησιμοποιούμενων διαλυμάτων για την παρασκευή του διαλύματος χρώσης του DNA παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.5.

Πίνακας 2.6: Διάλυμα χρώσης του DNA.

Διάλυμα Χρώσης του DNA των κυττάρων (Staining Solution)		
Διαλύματα (Stocks)	μL που προστίθενται σε 5mL διαλύματος PBS	Τελική Συγκέντρωση
<i>PI (4mg/mL σε DMSO)</i>	62	50μg/mL
<i>Tris.HCl (1M, pH 7.5)</i>	50	10mM
<i>(MgCl₂, 1M)</i>	25	5mM
<i>RNAse A (10mg/mL)</i>	5	10μg/mL

Αρχή της Μεθόδου

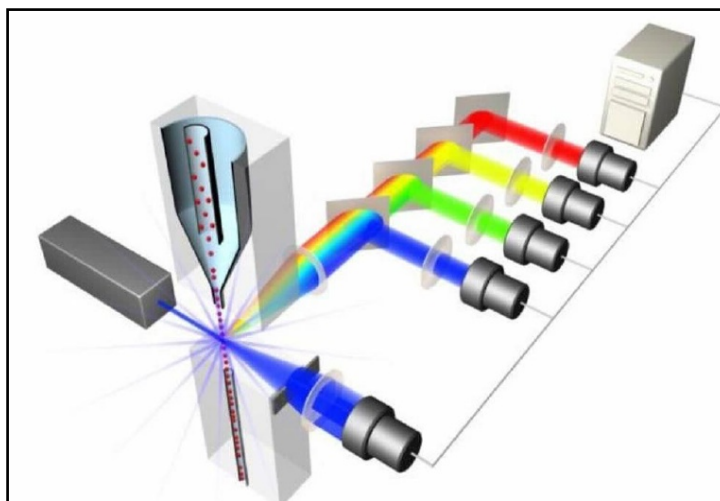
Η Κυτταρομετρία Ροής (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS) αποτελεί μια αυτοποιημένη μέθοδο, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί (i) για την ανάλυση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών κυττάρων και σωματιδίων, (ii) για την ποσοτική έκφραση κυτταρικών συστατικών και (iii) για την ανάλυση των κυτταρικών λειτουργιών και αλληλεπιδράσεων, και έχει ως βάση τη σκέδαση και το φθορισμό. Βρίσκει εφαρμογή σε διάφορους ανοσοφαινότυπους, στην ανάλυση του κυτταρικού κύκλου (ανίχνευση ανευπλοειδίας, καθορισμός (S-phase fraction), χρόνος ημί-ζωής καρκινικών κυττάρων) και σε άλλα ερευνητικά πεδία.

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά στην εφαρμογή για την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου, η μέθοδος βασίζεται στη χρήση χρωστικής ουσίας, η οποία προσδένεται στο DNA στοιχειομετρικά (DAPI, PI), το χρωματίζει και επιτρέπει τον καθορισμό του σταδίου του κυτταρικού κύκλου στο οποίο βρίσκεται ο υπό μελέτη κυτταρικός πληθυσμός. Κάποιες χρωστικές μπορούν να προσδένονται και σε RNA (PI) και απαιτούν την παρουσία RNάσης (RNAse). Τα κύτταρα συνήθως καθίστανται διαπερατά (με τη χρήση σαπωνίνης) καθώς το μέγεθος της χρωστικής ή η φύση της δεν επιτρέπει να φτάσει στον πυρήνα. Μονιμοποιητικά (που σταθεροποιούν τις μεμβράνες των κυττάρων) όπως η αιθανόλη ή η μεθανόλη μπορούν να προκαλούν μόνιμες οπές στη μεμβράνη και δεν χρειάζονται προετοιμασία ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί και αντίσωμα επιλογής πληθυσμού.

Αναλυτική Πορεία

Αφού γίνει η προετοιμασία των δειγμάτων, όπως αναλύθηκε παραπάνω, οι δοκιμαστικοί σωλήνες που φέρουν το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρονται σε φυγόκεντρο. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα που προκύπτει επαναιωρείται σε κατάλληλο όγκο του διαλύματος χρώσης που έχει παρασκευαστεί με τον τρόπο που αναφέρθηκε προηγουμένως (Πίνακας 2.6). Στη συνέχεια, αφού το DNA των κυττάρων χρωματιστεί (μετά από 15 λεπτά περίπου), τα δείγματα περνούν από τον κυτταρομετρητή ροής. Η γραφική απεικόνιση του κυτταρομετρητή ροής παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.3.

Αναλυτικότερα, μια δέσμη φωτός, συνήθως δέσμη λέιζερ, ενός μεμονωμένου μήκους κύματος κατευθύνεται διαμέσου μιας υδροδυναμικά συγκλίνουσας ροής υγρού. Ένας αριθμός ανιχνευτών περιβάλλει το σημείο στο οποίο η δέσμη φωτός διαπερνάει τη ροή του υγρού. Ένας από τους ανιχνευτές βρίσκεται σε ευθυγράμμιση με τη δέσμη φωτός, κάποιοι άλλοι είναι κάθετοι σε



Εικόνα 2.3: Γραφική απεικόνιση του κυτταρομετρητή ροής.

αυτήν και ένας ή περισσότεροι από αυτούς αποτελούν ανιχνευτές φθορισμού. Κάθε σωματίδιο μεταξύ 0.2 και 150μm αιωρούμενο στο υγρό που περνά διαμέσου της δέσμης σκεδάζει το φως προς κάποια κατεύθυνση και παράλληλα τα φθορίζοντα χημικά που βρίσκονται στο σωματίδιο ή επί της επιφάνειάς του μπορούν να διεγερθούν και να εκπέμψουν φως άλλου μήκους κύματος από αυτό που εκπέμπει η πηγή. Αυτός ο συνδυασμός σκεδασμένου και φθορίζοντος φωτός παραλαμβάνεται από τους ανιχνευτές και μετά τις απαραίτητες αναλύσεις είναι δυνατή η αποκόμιση πληροφοριών σχετικών με τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου. Η εμπρόσθια σκέδαση FSC (Forward Scattering) σχετίζεται με τον όγκο του κυττάρου (διπλασιασμένη μορφή, στάδια κυτταρικού κύκλου) και η πλάγια σκέδαση (SSC) (Side Scattering) εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (δομή, σχήμα του πυρήνα, πολυπλοκότητα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων, κοκκίωση- αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης).

2.6 Στατιστική επεξεργασία

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS, version 20.00. Λόγω κανονικής κατανομής του πληθυσμού (Kolmogorov-Smirnov test), οι συγκρίσεις κατά ζεύγη έγιναν με ανάλυση διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (one-way ANOVA). Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $p < 0.05$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Παραλαβή αφυδατωμένου αφεψήματος

Κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, πρώτο στάδιο αποτέλεσε η παρασκευή του ροφήματος από Μελισσόχορτο και ακολούθως η παραλαβή του στερεού υπολείμματος με τη μέθοδο της λυοφιλίωσης. Η μέθοδος της λυοφιλίωσης για την απομάκρυνση του μέσου εκχύλισης (νερό) επιλέχθηκε λόγω της αποτελεσματικότητάς της όσον αφορά την εξασφάλιση υψηλότερων επιπέδων φαινολικού περιεχομένου συγκριτικά με άλλες μεθόδους (*Abascal et al., 2005*). Στον Πίνακα 3.1 παρουσιάζεται η απόδοση του αφεψήματος σε στερεό υπόλειμμα εκφρασμένη ανά κούπα των 200mL.

Πίνακας 3.1: Απόδοση του αφεψήματος από Μελισσόχορτο σε στερεό υπόλειμμα ανά κούπα.

Βότανο	Μάζα αφυδατωμένου αφεψήματος (mg) ανά κούπα (200mL) (mg/κούπα)
Μελισσόχορτο	904,3 ± 23

Το αφέψημα παρασκευάστηκε κατά τον παραδοσιακό τρόπο, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.1. Παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την απόδοση σε στερεό υπόλειμμα αποτελούν η θερμοκρασία και ο χρόνος εκχύλισης, η αναλογία στερεού:υγρού καθώς και η πολικότητα και η συγκέντρωση του διαλύτη (*Ondrejovic et al., 2012; Arceusz & Wesolowski, 2013*). Έχει αναφερθεί, ότι όσο αυξάνεται η πολικότητα του διαλύτη τόσο μειώνεται η απόδοση σε στερεό υπόλειμμα (*Nackz & Shahidi, 2006*). Επομένως, η εκχύλιση με νερό που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα εργασία θεωρητικά οδήγησε σε μικρότερη απόδοση στερεού υπολείμματος συγκριτικά με τα αντίστοιχα αποτελέσματα απόδοσης που θα λαμβάνονταν στην περίπτωση που γινόταν χρήση κάποιου οργανικού διαλύτη.

Γενικά, τα βιβλιογραφικά δεδομένα αναφορικά με τα υδατικά εκχυλίσματα και τα αφεψήματα είναι περιορισμένα καθώς στην πλειοψηφία των μελετών οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι οργανικής φύσεως (*Kamatou et al., 2010; Kogiannou et al., 2013; Kaliora et al., 2014; Skotti et al., 2014*). Η απόδοση σε στερεό υπόλειμμα επηρεάζεται, επίσης, από παραμέτρους που αφορούν στο ίδιο το βότανο, όπως η κατάστασή του κατά τη συλλογή, η διάρκεια αποθήκευσής του πριν τη χρήση, η ποσότητα βοτάνου που θα χρησιμοποιηθεί για τις μετρήσεις καθώς και η περιεκτικότητά του σε βιοδραστικά συστατικά (*Nackz & Shahidi, 2006*).

3.2 Χημικές Αναλύσεις

3.2.1 Ανάλυση των Συστατικών του αφυδατωμένου αφεψήματος

3.2.1.1 Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο (Total Phenolic Content, TPC)

Το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο του αφεψήματος από Μελισσόχορτο προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2: Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) του αφεψήματος, εκφρασμένο σε mg ισοδυνάμων γαλλικού οξέος (GAE).

Βότανο	(mg GAE/κούπα 200 mL) ± SD
Μελισσόχορτο	341.9 ± 28.2

Όπως παρουσιάζεται και στον Πίνακα 3.2, η συνολική περιεκτικότητα του αφεψήματος ανέρχεται στα 341.9 mg GAE ανά κούπα. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η παραγωγή των βιοδραστικών συστατικών από τα φαρμακευτικά φυτά καθορίζεται σε σημαντικό βαθμό από τις γεωγραφικές και περιβαλλοντικές συνθήκες αλλά και από τις συνθήκες υπό τις οποίες αυτό καλλιεργήθηκε και αναπτύχθηκε (αναπτυξιακοί παράγοντες)(*Herrera-Carrera et al., 2015*). Μάλιστα, υποστηρίζεται ότι η έκθεση των φυτών σε συγκεκριμένο τύπο στρες όπως είναι εκείνος που προκαλείται από την ξηρασία μπορεί να βελτιστοποιήσει την παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών μέσω της επαγωγής φυσικών βιοχημικών μεταβολών στα ίδια τα φυτά και να οδηγήσει σε υψηλότερη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών συστατικών και, επομένως, σε μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα συγκριτικά με τα φρέσκα φυτά (*Manukyan, 2011; Suvarnakuta et al., 2011; Barros et al., 2013*). Με βάση τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι η σύγκριση των αποτελεσμάτων για το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων από το ίδιο βότανο δεν αποτελεί εύκολη υπόθεση, καθώς στην πλειοψηφία των μελετών οι ερευνητές εστιάζουν σε παραδοσιακά βότανα διαφόρων χωρών, τα οποία μπορεί να χαρακτηρίζονται από διαφορετική περιεκτικότητα σε βιοδραστικά συστατικά.

Δυο βασικοί παράγοντες που επιδρούν στο φαινολικό περιεχόμενο είναι η μέθοδος εκχύλισης και ο διαλύτης που χρησιμοποιείται (*Zhou & Yu, 2004; Kratchanova et al., 2010*). Η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη κρίνεται απαραίτητη τόσο για την ποσότητα όσο και για το ρυθμό εκχύλισης των πολυφαινολικών συστατικών και εξαρτάται από τη

διαλυτότητα και την πολικότητα των ουσιών που ενδιαφέρουν σε κάθε μελέτη (Xu & Chang, 2007; Azmir et al., 2013). Κατά την επιλογή του διαλύτη είναι, επίσης, σημαντικό να ληφθεί υπόψη ότι τα φαινολικά συστατικά ενδέχεται να απαντώνται σε μορφή πολυμερών ή/και να είναι συζευγμένα με άλλα μόρια, όπως πολυσακχαρίτες, πεπτίδια και ανόργανες ενώσεις (Nacz & Shahidi, 2004; Ghasemzadeh et al., 2011). Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι διαλύτες είναι η μεθανόλη, η αιθανόλη, η ακετόνη, το νερό και ο οξικός αιθυλεστέρας (Nacz & Shahidi, 2004). Στην παρούσα εργασία, ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το νερό προκειμένου το αφέψημα να προσομοιάζει κατά το δυνατόν περισσότερο τον παραδοσιακό τρόπο παρασκευής και να μελετηθεί ως τρόφιμο (στη μορφή δηλαδή που καταναλώνεται). Παρά το γεγονός ότι το νερό χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη πολικότητα σε σχέση με τους οργανικούς διαλύτες (για παράδειγμα, μεθανόλη) και ότι οι πολυφαινόλες εμφανίζουν καλή διαλυτότητα στους οργανικούς διαλύτες, έχει αναφερθεί ότι στα υδατικά εκχυλίσματα η παρουσία των φλαβονοειδών είναι αυξημένη συγκριτικά με οργανικά εκχυλίσματα αφεψημάτων (Pereira et al., 2009).

Άλλες παράμετροι που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο όσον αφορά το φαινολικό περιεχόμενο και που επηρεάζουν το επίπεδο ποιότητας των βιοδραστικών συστατικών αποτελούν ο χρόνος συλλογής καθώς και οι συνθήκες αποθήκευσης του φυτού (Herrera-Carrera et al., 2015). Αξίζει να σημειωθεί, ακόμη, ότι η ποσότητα βοτάνου που χρησιμοποιείται κατά την παρασκευή του αφεψήματος, ο χρόνος βρασμού καθώς και η θερμοκρασία επιδρούν σημαντικά στο συνολικό φαινολικό περιεχόμενο (Dai & Mumper, 2010).

3.2.1.2 Ολικές φλαβονόλες

Μετά τον προσδιορισμό του συνολικού φαινολικού περιεχομένου, προσδιορίστηκαν οι ολικές φλαβονόλες που περιέχονται στο αφέψημα από Μελισσόχορτο. Το περιεχόμενο του αφεψήματος σε ολικές φλαβονόλες, παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.3, εκφρασμένο σε mg ισοδυνάμων ρουτίνης.

Πίνακας 3.3: Περιεκτικότητα αφεψήματος σε ολικές φλαβονόλες, εκφρασμένη σε mg ισοδυνάμων ρουτίνης.

Βότανο	μg Ρουτίνης/κούπα (200 mL) ± SD
Μελισσόχορτο	54.8 ± 9.5

Οι φλαβονόλες αποτελούν μια υποκατηγορία των φλαβονοειδών, όπως αναφέρεται στην υποενότητα 1.2.2.1, στις οποίες ανήκουν ουσίες όπως η κερκετίνη, η καμπφερόλη, η μυρισετίνη και η ρουτίνη και αποτελούν τα πιο συχνά απαντώμενα φλαβονοειδή στα τρόφιμα (*Theodoratou et al., 2007*). Έχει αναφερθεί, μάλιστα, ότι τα διάφορα φλαβονοειδή που περιέχονται στα φυτά είναι εκείνα που ευθύνονται για την αποτελεσματική τους δράση όσον αφορά στη δέσμευση των ελευθέρων ριζών (*Spencer, 2010*). Υπάρχουν πολλές μελέτες που αναφέρουν την ευεργετική επίδραση των φλαβονολών σε περιπτώσεις καρκίνου. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι η κερκετίνη και η καμπφερόλη είναι σε θέση να δρουν ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες σε καρκινικές σειρές του παχέος εντέρου, του προστάτη και του μαστού μέσω αναστολής του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων και επίδρασης σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος (*Ackland et al., 2005; Dihal et al., 2006*). Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι οι συνθήκες εκχύλισης του αφεψήματος, όπως ο διαλύτης που χρησιμοποιείται και ο χρόνος εκχύλισης, ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοση σε ολικές φλαβονόλες (*Rusak et al., 2008*).

3.2.1.3 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός απλών πολυφαινολών και τερπενικών οξέων με τη μέθοδο GC-MS

Ο προσδιορισμός των απλών φαινολών και των τερπενικών οξέων που περιέχονται στο αφέψημα από Μελισσόχορτο έγινε με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας, συζευγμένης με φασματοσκοπία μάζας (GS-MS). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.4.

Πίνακας 3.4: Περιεχόμενο του αφεψήματος από Μελισσόχορτο σε απλές φαινόλες και τερπενικά οξέα.

<i>Ένωση</i>	<i>μg/κούπα</i>	<i>±SD</i>
Φαινολικά- Υδροξυ-βενζοϊκά Οξέα (μg/κούπα)		
<i>p</i> -υδροξυ-βενζοϊκό οξύ	5.9	0.5
Γαλλικό οξύ	0.23	0.05
<i>p</i> -υδροξυ-φαινυλοξικό οξύ	2.12	0.23
3-4 δι-υδροξυ-φαινυλοξικό οξύ	253.4	40.2
Πρωτοκατεχικό οξύ	12.7	0.8
Συριγγικό οξύ	3.9	0.3
Βανιλλικό οξύ	1.3	0.3
Φαινόλες (μg/κούπα)		
Τυροσόλη	0.5	0.05
Βανιλίνη	1.6	0.3
Υδροξυ-Κινναμωμικά Οξέα (μg/κούπα)		
Καφεϊκό οξύ	543.6	33.0
Χλωρογενικό οξύ	1.2	0.9
Κινναμωμικό οξύ	8.3	12.7
<i>p</i> -κουμαρικό οξύ	22.7	3.9
Φερουλικό οξύ	7.25	0.8
Φλωρετικό οξύ	4.1	0.0
Ροσμαρινικό οξύ	43558.2	1735.7
Σιναπικό οξύ	0.7	0.14
Φλαβονοειδή (μg/κούπα)		
Καμπφερόλη	0.2	0.0

Ναρινγκενίνη	1.03	0.0
Τερπενοειδείς Φαινόλες (μg/κούπα)		
Καρβακρόλη	668.5	25.4
Θυμόλη	4189.6	82.9
Τερπενικά Οξέα (μg/κούπα)		
Ολεανολικό οξύ	57.4	7.6
Ουρσολικό οξύ	14.6	5.2

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν, το αφέψημα από Μελισσόχορτο περιέχει μεγάλη ποσότητα φυτοχημικών. Συνολικά ανιχνεύθηκαν 23 ενώσεις στις οποίες συμπεριλαμβάνονται: (α) υδροξυ-βενζοϊκά οξέα με κυριότερους εκπροσώπους το 3-4 δι-υδροξυ-φαινυλοξικό οξύ και το πρωτοκατεχικό οξύ, (β) υδροξυ-κινναμωμικά οξέα με βασικότερο εκπρόσωπο το ροσμαρινικό οξύ και σε μικρότερο βαθμό το καφεϊκό οξύ, το *p*-κουμαρικό οξύ, το κινναμωμικό οξύ και το φερουλικό οξύ, (γ) οι φαινόλες τυροσόλη και βανιλίνη, (δ) τα φλαβονοειδή καμπερόλη (φλαβονόλη) και ναρινγκενίνη (φλαβανόνη), (ε) οι τερπενοειδείς φαινόλες θυμόλη και καρβακρόλη, οι οποίες ανιχνεύθηκαν σε σημαντικές ποσότητες καθώς και (στ) τα τερπενικά οξέα (τριτερπενικά) ολεανολικό οξύ και ουρσολικό οξύ.

Όπως γίνεται φανερό το συστατικό που περιέχεται σε μεγαλύτερη ποσότητα στο αφυδατωμένο αφέψημα είναι το ροσμαρινικό οξύ. Το αποτέλεσμα αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα άλλων μελετών στις οποίες έγινε χημική ανάλυση του συγκεκριμένου βοτάνου (Carnat et al., 1998; Dastmalchi et al., 2008; Chung et al., 2010; Barros et al., 2013). Ειδικά για το ροσμαρινικό οξύ, έχει αναφερθεί ότι αποτελεί το συστατικό που βρίσκεται σε αφθονία στην πλειοψηφία των βοτάνων που ανήκουν στην οικογένεια *Lamiaceae* (Fecka & Turek, 2007; Lee, 2010). Τα μονοτερπένια, θυμόλη και καρβακρόλη ανιχνεύθηκαν, επίσης, σε μεγάλη ποσότητα, όπως αναφέρθηκε πρόσφατα και σε μια άλλη μελέτη (Cosge et al., 2009; Rostami et al., 2012) ενώ τα συστατικά που μετρήθηκαν σε μικρότερες ποσότητες στο δείγμα ήταν το γαλλικό οξύ και η καμπερόλη. Η παρουσία του γαλλικού, του καφεϊκού, του πρωτοκατεχικού, του φερουλικού, του *p*-κουμαρικού, του χλωρογενικού, του ολεανολικού και του ουρσολικού οξέος καθώς και της ναρινγκενίνης έχει, επίσης, αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες (Carnat et al., 1998;

Ulbricht et al., 2005; Zgórk & Glowniak, 2006; Fecka & Turek, 2007; Dastmalchi et al., 2008; Basar & Zaman, 2013; Pereira et al., 2014).

Ωστόσο, σε άλλα δείγματα Μελισσόχορτου εντοπίζονται σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις ουσίες οι οποίες δεν ανιχνεύθηκαν στο παρόν δείγμα. Στις ουσίες αυτές συμπεριλαμβάνονται τα φλαβονοειδή κερκετίνη, απιγενίνη και λουτεολίνη (Zgórk & Glowniak, 2006; Fecka & Turek, 2007). Η απουσία των συστατικών που δεν ανιχνεύθηκαν κατά την ανάλυση του συγκεκριμένου δείγματος Μελισσόχορτου μπορεί να οφείλεται στο διαφορετικό υπο-είδος (*sub-species*) του φυτού και στις διαφορετικές κλιματολογικές και γεωγραφικές συνθήκες στις οποίες αυτό αναπτύχθηκε συγκριτικά με τις αντίστοιχες στις οποίες αναπτύχθηκε το Μελισσόχορτο από άλλες χώρες. Ακόμη, παράγοντες όπως η θερμοκρασία, ο τρόπος ξήρανσης και αποθήκευσης, η εποχή που έγινε η συλλογή του βοτάνου καθώς και το τμήμα του φυτού που χρησιμοποιήθηκε μπορεί να επηρεάσουν τα φαινορικά συστατικά που θα εκχυλιστούν από το δείγμα (Bergonzi et al., 2001; Wang & Zheng, 2001; Skotti et al., 2014). Επιπλέον, η διαφορά ως προς την ειδικότητα των μεθόδων εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκαν όπως και η επιλογή του διαλύτη μπορεί να συμβάλλουν στην παρατήρηση διαφορετικών αποτελεσμάτων (Liu et al., 2007; Dastmalchi et al., 2008). Ωστόσο, κάποιες ενώσεις που δεν ανιχνεύθηκαν στο υπό μελέτη δείγμα (απιγενίνη, λουτεολίνη) από το αφέψημα Μελισσόχορτου οφείλεται στη συγκεκριμένη μέθοδο ταυτοποίησης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.

Ακολουθεί ένας συνοπτικός πίνακας (Πίνακας 3.5) στον οποίο παρουσιάζονται συνολικά τα βιοδραστικά συστατικά που εκχυλίστηκαν με τη μέθοδο GC-MS.

Πίνακας 3.5: Συνολικό Περιεχόμενο Πολυφαινολικών Συστατικών του αφεψήματος από Μελισσόχορτο (mg/κούπα 200mL).

Σύνολο Πολυφαινολικών Συστατικών του αφεψήματος από Μελισσόχορτο (mg/κούπα 200mL)	
Συνολικές Απλές Φαινόλες	49.3 ± 1.94
Φαινολικά Οξέα	0.28 ± 0.04
Υδροξυκινναμωμικά Οξέα	44.2 ± 1.8
Τερπενοειδείς Φαινόλες	4.9±0.11
Τερπενικά Οξέα	0.07 ± 0.01
Φλαβονοειδή	1.22 ± 0.00

Με υπολογισμούς, σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα, προκύπτει ότι τα φαινολικά οξέα αποτελούν το 0.57% του συνολικού φαινολικού περιεχομένου, με το 3,4-διυδροξυ-φαινυλοξικό οξύ να αντιπροσωπεύει το 91% αυτών. Ακόμη, τα υδροξυ-κινναμωμικά οξέα αντιστοιχούν στο 89.6% του συνολικού φαινολικού περιεχομένου με κύριο εκπρόσωπο το ροσμαρινικό οξύ που αντιπροσωπεύει το 98.7% αυτής της κατηγορίας και, τέλος, οι τερπενοειδείς φαινόλες (θυμόλη και καρβακρόλη) αντιστοιχούν στο 9.86% του συνολικού περιεχομένου σε φαινολικά συστατικά.

3.2.1.4 Ποιοτικός προσδιορισμός φαινολικών συστατικών του αφυδατωμένου αφεψήματος με τη μέθοδο LC-DAD-MS

Ο ποιοτικός προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών του αφυδατωμένου αφεψήματος έγινε με τη μέθοδο LC/MS. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.6. και στο Σχήμα 3.6

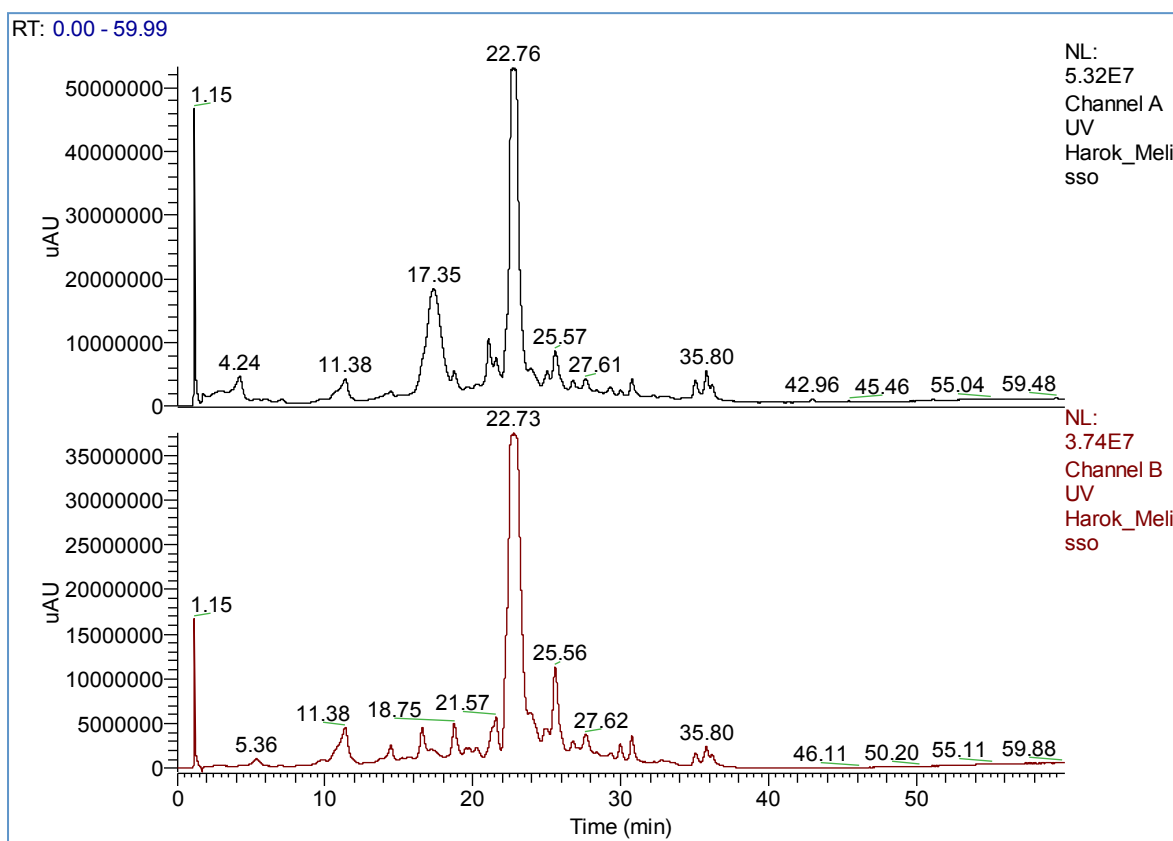
Πίνακας 3.6: Ποιοτικός Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών του αφεψήματος (οι χρόνοι RT αναφέρονται στα χρωματογραφήματα του Σχ 3.6.α)

<i>Μελισσόχορτο (Melissa officinalis L.)</i>	
<i>RT</i>	<i>Ένωση</i>
11.38	Παράγωγο Φερουλικού οξέος
17.35	Διμερές Κατεχίνης (προκυανιδίνη)
18.75	Παράγωγο Φερουλικού οξέος
21.57	Ροσμαρινικό οξύ, εκλούμενο μαζί με παράγωγο χλωρογενικού οξέος
22.76	Ροσμαρινικό οξύ
25.56	Γλυκουρονικό παράγωγο λουτεολίνης στο 7'-OH ή στο 4'-OH
27.62	Άγνωστη ένωση
35.8	Άγνωστη ένωση

Η ανάλυση LC/MS του αφυδατωμένου αφεψήματος Μελισσόχορτου οδήγησε στο διαχωρισμό και την αναγνώριση 8 ενώσεων. Μεταξύ αυτών αναγνωρίστηκε το ροσμαρινικό οξύ καθώς και ενώσεις που αποτελούν παράγωγα υδροξυ-κινναμωμικών

οξέων, όπως τα δυο παράγωγα του φερουλικού οξέος και το παράγωγο του χλωρογενικού οξέος που εκλούστηκε μαζί με ροσμαρινικό οξύ. Επιπλέον, αναγνωρίστηκε ένα διμερές της φλαβανόλης κατεχίνης και ένα γλυκουρονικό παράγωγο της λουτεολίνης ενώ δυο από τις κορυφές δεν αντιστοιχούσαν σε κάποια γνωστή ένωση.

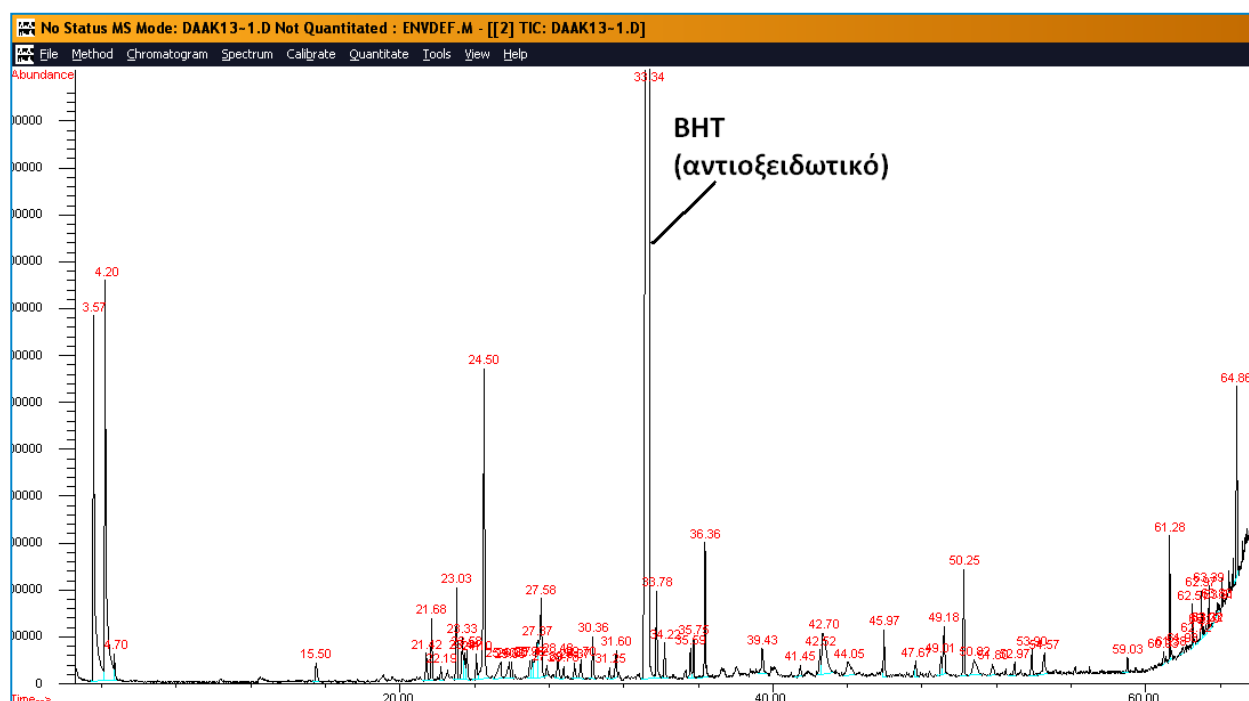
Η παρουσία του ροσμαρινικού οξέος (διμερές του καφεϊκού οξέος) και του γλυκουρονικού παραγώγου της λουτεολίνης (luteolin-7'-O-glucuronide) έχουν αναφερθεί και σε άλλες μελέτες που πραγματοποίησαν ποιοτικό προσδιορισμό του Μελισσόχορτου (Fecka & Turek, 2007; Lee, 2010). Σε άλλες μελέτες έχει αναφερθεί, επίσης, η παρουσία του καφεϊκού οξέος, παραγώγων του καφεϊκού οξέος (κυρίως τριμερή και τετραμερή), παραγώγων της απιγενίνης καθώς και του γλυκουρονικού παραγώγου της λουτεολίνης luteolin-3'-O-glucuronide, το οποίο αποτελεί σύμφωνα με τους ερευνητές το κυρίαρχο φλαβονοειδές του Μελισσόχορτου (Heitz et al., 2000; Patora & Klimek, 2002; Lee, 2010; Barros et al., 2013).



Σχήμα 3.6.α : Χρωματογράφημα LC-DAD-MS φαινολικών συστατικών του αφεψήματος μελισσόχορτου.

3.2.1.5 Ποιοτικός προσδιορισμός πτητικών συστατικών του αφυδατωμένου αφεψήματος με τη μέθοδο GC-MS

Τα πτητικά συστατικά είναι υπεύθυνα για το χαρακτηριστικό άρωμα που αναδίδουν τα φυτά και αντιπροσωπεύουν περίπου το 1% των δευτερογενών μεταβολιτών που παράγονται από αυτά (Dudareva et al., 2006). Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί τουλάχιστον 1700 πτητικές ενώσεις. Στα πτητικά συστατικά συμπεριλαμβάνονται ουσίες, οι οποίες στην πλειοψηφία τους αποτελούν λιπόφιλα προϊόντα και χαρακτηρίζονται από μικρό μοριακό βάρος (< 300). Οι κύριες κατηγορίες πτητικών συστατικών είναι οι ακόλουθες: (α) τερπενοειδή (μονοτερπένια, δι-τερπένια, σесκιτερπένια), (β) παράγωγα λιπαρών οξέων- συμπεριλαμβανομένων προϊόντων του μονοπατιού των λιποξυγονασών-, (γ) παράγωγα αμινοξέων, (δ) βενζοειδή και φαινυλο-προπανοειδή, (ε) C₅-διακλαδισμένες ενώσεις και (στ) διάφορες αζωτούχες και θειούχες ενώσεις. Σχεδόν όλες οι προαναφερθείσες ενώσεις εκπέμπονται από τα βλαστικά μέρη του φυτού, όπως οι ρίζες, τα φύλλα και τα άνθη και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία του φυτού αλλά και στη αναπαραγωγική του διαδικασία (Dudareva et al., 2004; Steeghs et al., 2004; Dudareva et al., 2006)



Σχήμα 3.6.β Χρωματογράφημα GC-MS των πτητικών συστατικών του αφεψήματος μελισσόχορτου

Το επιστημονικό ενδιαφέρον όσον αφορά τα πτητικά συστατικά των φυτών, συμπεριλαμβανομένων των αιθέριων ελαίων που αποτελούν αρωματικά και πτητικά ελαιώδη υγρά, έγκειται στο γεγονός ότι εκδηλώνουν σημαντικές βιολογικές δράσεις. Οι βιβλιογραφικές αναφορές για το αιθέριο έλαιο του Μελισσόχορτου επισημαίνουν το ρόλο του ως αντιμικροβιακού, αντιβακτηριακού και αντιϊκού παράγοντα, γι αυτό και χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων ως συντηρητικό (Friedman et al., 2004; Gutierrez et al., 2008; Mazzanti et al., 2008). Επιπλέον, έχει αναφερθεί η αντιοξειδωτική και χημειοπροστατευτική του δράση (Janina, 2003; Mimica-Dukic et al., 2004).

Ο ποιοτικός προσδιορισμός των πτητικών συστατικών του αφυδατωμένου αφεψήματος Μελισσόχορτου πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο GC/MS και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.7 και το Σχήμα 3.6.β. Ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε με τη μέθοδο εσωτερικού προτύπου. Στην παρούσα ενότητα χρησιμοποιήθηκαν δυο εσωτερικά πρότυπα, ένα αλκάνιο με 8 άτομα άνθρακα (C₈: οκτάνιο, πτητική ένωση) και ένα αλκάνιο με 20 άτομα άνθρακα (C₂₀: εικοσάνιο, λιγότερο πτητική ένωση). Στον Πίνακα 3.7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μέθοδο και για τα δυο εσωτερικά πρότυπα. Παρατίθεται ο υπολογισμός του μέσου όρου της ποσότητας που ανιχνεύθηκε για κάθε ένωση και παρουσιάζεται το ποσοστό (%) των ενώσεων επί του συνολικού περιεχομένου σε πτητικά συστατικά με βάση το σύνολο που προκύπτει από τον μέσο όρο των ποσοτήτων (67,81 μg) που θεωρούμε ότι αντιστοιχεί στο 100% των πτητικών συστατικών.

Πίνακας 3.7: Ποιοτικός Προσδιορισμός των πτητικών συστατικών του αφυδατωμένου αφεψήματος.

Ένωση	% match	Rt (min)	Ποσότητα (μg) βάσει του C ₈ (Εσωτερικό Πρότυπο)	Ποσότητα (μg) βάσει του C ₂₀ (Εσωτερικό Πρότυπο)	Μέσος όρος ποσότητας (μg)	% συνόλου
Βενζυλική αλκοόλη	90	12.48	0.67	1.79	1.23	1.81
Οξείδιο της <i>cis</i> -λιναλοόλης	91	14.00	0.04	0.10	0.07	0.10
Οξείδιο της <i>trans</i> -λιναλοόλης	91	14.72	0.03	0.09	0.06	0.09
Εννεανάλη	91	15.50	0.63	1.68	1.16	1.71
Κιτρονελλάλη	93	17.72	0.10	0.26	0.18	0.27

Οκτανοϊκό οξύ	87	19.10	0.51	1.35	0.93	1.37
2-αιθυλ-3-μεθυλ- μηλεϊμίδιο	95	21.42	0.99	2.64	1.82	2.68
Νεράλη (κιτράλη Β)	94	21.68	1.74	4.61	3.18	4.69
Πιπεριτόνη	96	22.21	0.43	1.13	0.78	1.15
Μεθυλ-βινυλ- μηλεϊμίδιο	90	22.53	0.44	1.18	0.81	1.19
Γερανιάλη, (κιτράλη Α)	97	23.03	2.63	6.99	4.81	7.09
Θυμόλη	95	24.18	0.85	2.26	3.11	4.59
Καρβακρόλη	95	24.82	11.51	30.56	21.04	31.0
Νερικό οξύ	87	25.88	0.94	2.49	1.72	2.54
Ευγενόλη	92	26.76	0.06	0.15	0.11	0.16
Γερανικό οξύ	90	27.37	2.91	7.72	5.32	7.84
Βανιλίνη	96	28.76	0.99	2.62	1.81	2.67
Σαφρανάλη	90	29.37	0.62	1.64	1.13	1.67
2,6-δι-τερτ- βουτυλ- <i>p</i> - βενζοκινόνη	90	31.35	0.37	0.98	0.68	1.0
Καλαρένιο	90	31.76	0.27	0.72	0.5	0.74
Δι-υδρο- ακτινιδιολίδη	94	34.04	2.63	6.98	4.81	7.09
Οξείδιο καρυοφυλλενίου	90	35.75	1.18	3.14	2.16	3.19
3-υδροξυ- <i>b</i> - δαμασκόνη	90	37.38	0.35	0.92	0.64	0.94
<i>p</i> -μεθυλ- βενζυλαλκοόλη	94	39.08	0.19	0.50	0.35	0.52
Λολιολίδη, 2(4H)- βενζο-φουρανόνη	94	42.72	5.14	13.66	9.4	13.9
Σύνολο (μg)			36.22	96.16	67.81	100%

Ο διαχωρισμός των συστατικών του εκχυλίσματος έγινε με αέρια χρωματογραφία (GC) ενώ η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός τους έγινε με φασματοσκοπία μάζας (MS) με χρήση δύο εσωτερικών προτύπων. Στον Πίνακα 3.7 παρουσιάζονται οι κυριότερες ενώσεις που ανιχνεύθηκαν στο εκχύλισμα του αφεψήματος Μελισσόχορτου. Συνολικά

ανιχνεύθηκαν 25 ενώσεις με την καρβακρόλη να αποτελεί το συστατικό που ανιχνεύθηκε σε υψηλότερο ποσοστό (31%).

Όπως γίνεται φανερό, στο εκχύλισμα Μελισσόχορτου περιέχονται πολλά μονοτερπένια (κυρίως με μορφή αλκοόλης, αλδεϋδης ή κετόνης) όπως η καρβακρόλη, η θυμόλη, η γερανιάλη, η Ζ-κιτράλη, η κιτρονελλάλη, η νεράλη και η ευγενόλη καθώς και τα οξείδια μονοτερπενικών ενώσεων (οξυγονωμένα μονοτερπένια) όπως εκείνα της *cis*- και *trans*-λιναλοόλης και το οξυγονωμένο σεσκιτερπένιο οξείδιο του καρυοφυλλενίου, που αποτελούν γνωστά πτητικά συστατικά. Σύμφωνα και με άλλες μελέτες, οι οποίες στην πλειοψηφία τους αναφέρονται στη χημική ανάλυση του αιθέριου ελαίου που απομονώνεται από το Μελισσόχορτο, οι ενώσεις που ανευρίσκονται σε μεγαλύτερα ποσοστά είναι η νεράλη και η γερανιάλη, που αποτελούν ισομερή της κιτράλης Β και Α αντίστοιχα) αλλά και η κιτρονελλάλη (*Carnat et al., 1998; Sari & Ceylan, 2002; Mimica-Dukic et al., 2004; Taherpour et al., 2012; Sharopov et al., 2013; Abdellatif et al., 2014; Verma et al., 2015*). Στην παρούσα εργασία, η νεράλη, η γερανιάλη ανήκουν στα συστατικά που η ανίχνευσή τους σημείωσε κάποια από τα υψηλότερα ποσοστά (4.69% και 7.09% αντίστοιχα)

Σε μια μελέτη αναφορικά με τη χημική σύσταση του αιθέριου ελαίου Μελισσόχορτου που αναπτύσσεται στην Τουρκία αναφέρθηκε ότι η θυμόλη (0.4-11.94%) και το β-καρυοφυλλένιο (5.91-7.27%) συγκαταλέγονταν, επίσης, στα συστατικά που εντοπίστηκαν σε κάποια από τα μεγαλύτερα ποσοστά μαζί με την κιτρονελλάλη και την κιτράλη (*Cosge et al., 2009*). Παρόλο που η θυμόλη ανιχνεύθηκε σε σημαντικό ποσοστό (4.59%) και στο παρόν εκχύλισμα Μελισσόχορτου, το β-καρυοφυλλένιο δεν αναγνωρίστηκε. Αναγνωρίστηκε, ωστόσο, το οξυγονωμένο παράγωγό του- οξείδιο καρυοφυλλενίου- σε ποσοστό 3.19%. Η παρουσία του συστατικού αυτού επιβεβαιώνεται και από την εργασία των *Basta* και των συνεργατών του που μελέτησαν 3 διαφορετικά δείγματα εκχυλίσματος Μελισσόχορτου που αναπτύσσονται σε διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας, στα οποία μάλιστα ανιχνεύθηκε σε αρκετά υψηλότερα ποσοστά (12.6-24.4%) (*Basta et al., 2005*), καθώς και από άλλες μελέτες (*Norouzi et al., 2012; Sharopov et al., 2013; Abdellatif et al., 2014; Verma et al., 2015*).

Άλλα συστατικά που έχουν ανιχνευθεί στο εκχύλισμα Μελισσόχορτου με τη μέθοδο GC/MS, χωρίς όμως να επιβεβαιώνονται στην παρούσα μελέτη, αποτελούν το λιμονένιο (*Basta et al., 2005; Sharopov et al., 2013*), το β-πινένιο (*Sari & Ceylan, 2002; Basta et al., 2005*), η λιναλοόλη (*Sari & Ceylan, 2002; Patora et al., 2003; Basta et al., 2005; Chung et al.,*

2010), το γ-τερπινένιο (Basta et al., 2005; Sharopov et al., 2013), η γερανιόλη (Hussain et al., 2011; Saeb et al., 2012), το α-πινένιο (Basta et al., 2005; Norouzi et al., 2012) και η (E)-ανηθόλη (Sharopov et al., 2013). Αξίζει να αναφερθεί ότι παρά τη σημαντική παρουσία της καρβακρόλης στο παρόν δείγμα εκχυλίσματος Μελισσόχορτου, σε καμία από τις προαναφερθείσες μελέτες δε γίνεται λόγος για την παρουσία της στα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν. Ομοίως, και για τις ενώσεις λιλιολίδη, γερανικό οξύ και δι-υδρο-ακτινιδιολίδη, οι οποίες, επίσης, ανιχνεύθηκαν σε αρκετά σημαντικά ποσοστά (13.9%-7.84% και 7.09% αντίστοιχα).

Γίνεται, επομένως, σαφές ότι οι παράγοντες που αναφέρθηκαν στην παράγραφο 3.2.1.3 μπορούν να επηρεάσουν σε σημαντικό βαθμό τα αποτελέσματα που προκύπτουν όταν πρόκειται για τον προσδιορισμό των συστατικών ενός δείγματος. Συγκεκριμένα για το αιθέριο έλαιο Μελισσόχορτου, έχει φανεί ότι ο τρόπος ξήρανσης δεν επηρεάζει το πλήθος των συστατικών που ανιχνεύονται. Συνδυαστικά, όμως, με την κατάλληλη εποχή συγκομιδής μπορούν να επιτευχθούν υψηλότερα ποσοστά σε μονοτερπένια, σεσκιτερπένια ή άλλες πτητικές ενώσεις (Khalid et al., 2013).

3.2.2 Αντιοξειδωτική Δράση

Από τα αποτελέσματα που περιγράφονται παραπάνω, γίνεται φανερό ότι το αφέψημα από Μελισσόχορτο είναι πλούσιο σε βιοδραστικά συστατικά. Όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο I, οι ευεργετικές δράσεις του Μελισσόχορτου στην υγεία αποδίδονται κατά κύριο λόγο στην παρουσία των φυτοχημικών (Encalada et al., 2011). Η οξειδωτική βλάβη στα διάφορα κυτταρικά συστήματα αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει την έναρξη αλυσιδωτών αντιδράσεων οξείδωσης ελευθέρων ριζών που ακολουθούνται από βήματα διάδοσης (Valko et al., 2007). Μια από τις βασικότερες δράσεις που εκδηλώνουν τα φυτοχημικά είναι η αντιοξειδωτική. Ακολουθώντας παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που αφορούν στην ικανότητα του Μελισσόχορτου να λειτουργεί ως φυσικό αντιοξειδωτικό, μέσω της ικανότητάς του (1) να δεσμεύει τη σταθερή ελεύθερη ρίζα DPPH•, (2) να ανάγει τον τρισθενή σίδηρο (Fe^{3+}) σε δισθενή (Fe^{2+}) αλλά και (3) να δημιουργεί χηλικά σύμπλοκα με κατιόντα μετάλλων σιδήρου (Fe^{2+}) και χαλκού (Cu^{2+}).

3.2.2.1 Ικανότητα Δέσμευσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH•

Η δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH• αποτελεί την πιο κοινή μέθοδο αξιολόγησης της ικανότητας των φυσικών προϊόντων να δεσμεύουν και να εκκαθαρίζουν ελεύθερες ρίζες. Η συγκεκριμένη ελεύθερη ρίζα λειτουργεί ως οξειδωτικό υπόστρωμα αλλά και ως

μόριο-δείκτης της αντίδρασης (*Dastmalchi et al., 2008*). Στον Πίνακα 3.8 παρουσιάζεται η ικανότητα του αφεψήματος από Μελισσόχορτο να δεσμεύει την ελεύθερη ρίζα DPPH•.

Πίνακας 3.8.: Ικανότητα του αφεψήματος να δεσμεύει την ελεύθερη ρίζα DPPH•, εκφρασμένη σε mg ισοδυνάων Trolox (TE).

Βότανο	(mg TE/κούπα 200 mL) ± SD
Μελισσόχορτο	469.8 ± 0.79

Το αποτέλεσμα υποδεικνύει ότι το αφέψημα από Μελισσόχορτο μπορεί να δεσμεύει αποτελεσματικά τη σταθερή ελεύθερη ρίζα DPPH• και, επομένως, μπορεί να αποτρέπει την έναρξη και την προαγωγή αλυσιδωτών αντιδράσεων ελευθέρων ριζών που συμβάλλουν στην εμφάνιση οξειδωτικού στρες. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα άλλων μελετών στις οποίες διαπιστώθηκε, επίσης, ότι το αφέψημα από Μελισσόχορτο επιδεικνύει αντιοξειδωτική δράση μέσω της ικανότητας του να δεσμεύει τη συγκεκριμένη ελεύθερη ρίζα (*Dastmalchi et al., 2008; Kamdem et al., 2013; Skotti et al., 2014*).

Σε μια πρόσφατη μελέτη, οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι το αφέψημα από Μελισσόχορτο επιδεικνύει τη μεγαλύτερη δραστικότητα και αποτελεσματικότητα όσον αφορά τη δέσμευση ελευθέρων ριζών συγκριτικά με τα υπόλοιπα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* που ερευνήθηκαν. Οι ερευνητές υποστήριξαν ότι αυτή η υπεροχή του Μελισσόχορτου μπορεί να αποδοθεί στην υψηλή περιεκτικότητα ροσμαρινικού οξέος, το οποίο διαθέτει ιδανική δομή για την άμεση μεταφορά ηλεκτρονίων στις αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών, λόγω της παρουσίας των δυο ορθο-διυδροξυ-ομάδων (ομάδες κατεχόλης) στο βενζολικό δακτύλιο (*Capeccka et al., 2005*). Το καφεϊκό οξύ έχει αποδειχθεί, επίσης, πολύ δραστικό όσον αφορά τη δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH• και του ανιόντος του υπεροξειδίου (*Gulcin, 2006*) ενώ, αντίθετα, το 3'-Ο-γλυκουρονικό παράγωγο της λουτεολίνης χαρακτηρίζεται από χαμηλή αντιοξειδωτική ικανότητα (*Lu & Foo, 2001*). Επιπρόσθετα, σε μια μελέτη σχετικά με την αντιοξειδωτική δράση φαρμακευτικών φυτών της Μεσογείου αναφέρθηκε ότι τα υδατικά διαλύματα των φυτών που εκχυλίστηκαν με ζεστό νερό ως διαλύτη, όπως και στην παρούσα μελέτη, εμφάνισαν τη μεγαλύτερη ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών (*Farzaneh & Carvalho, 2015*) ενώ σε άλλη μελέτη επισημάνθηκε ότι το υδατικό εκχύλισμα Μελισσόχορτου ήταν εκείνο που εμφάνισε την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση (*Pereira et al., 2009*).

3.2.2.2 Αναγωγική Ισχύς του αφεψήματος

Η αναγωγική ισχύς συσχετίζεται σημαντικά με την αντιοξειδωτική ικανότητα (*Okta et al., 2003*). Ενώσεις που διαθέτουν αναγωγική ισχύ αποτελούν δότες ηλεκτρονίων γι αυτό και είναι σε θέση να αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες με στόχο τη σταθεροποίησή τους ή τη διακοπή των αλυσιδωτών αντιδράσεων που αυτές εκκινούν (*Kamdern et al., 2013*). Μέσω αυτής της δράσης συμβάλλουν και στην αναγωγή των οξειδωμένων ενδιάμεσων που σχηματίζονται κατά τις διαδικασίες υπεροξείδωσης των λιπιδίων (*Chanda & Dave, 2009*). Στον Πίνακα 3.9 παρουσιάζεται η αναγωγική δύναμη του αφεψήματος από Μελισσόχορτο, εκφρασμένη σε mg ισοδυνάμων ασκορβικού οξέος.

Πίνακας 3.9.: Προσδιορισμός αναγωγικής δύναμης του αφεψήματος, εκφρασμένη σε mg ισοδυνάμων ασκορβικού οξέος (AAE).

Βότανο	(mg AAE/κούπα 200 mL) $\pm$ SD
Μελισσόχορτο	519.9 $\pm$ 13.01

Όπως γίνεται φανερό από τον παραπάνω πίνακα, το αφέψημα από Μελισσόχορτο χαρακτηρίζεται από αναγωγική ισχύ, δηλαδή είναι σε θέση να ανάγει τον τρισθενή σίδηρο (Fe^{3+}) σε δισθενή (Fe^{2+}). Η ικανότητα αυτή αποτελεί έναν σημαντικό μηχανισμό εκδήλωσης αντιοξειδωτικής δράσης (*Hinnenburg et al., 2006*). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται και από άλλους ερευνητές, οι οποίοι αναφέρουν την παρουσία αναγωγικών παραγόντων στο αφέψημα από Μελισσόχορτο και, μάλιστα, σε υψηλές συγκεντρώσεις, υποστηρίζοντας ότι οι παράγοντες αυτοί συμβάλλουν σε σημαντικό βαθμό στην αντιοξειδωτική ικανότητα του (*Dastmalchi et al., 2008; Pereira et al., 2009; Lin et al., 2012*). Μια πρόσφατη μελέτη απέδειξε ότι ενώσεις όπως η θυμόλη, η καρβακρόλη και η ευγενόλη εκτός από την ικανότητά τους να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες, εμφανίζουν και αναγωγική ισχύ (*Horvathova et al., 2014*) ενώ από αναγωγική ικανότητα χαρακτηρίζεται και το καφεϊκό οξύ (*Gulcin, 2006*).

3.2.2.3 Ικανότητα Δημιουργίας Χηλικών Συμπλόκων με κατιόντα μετάλλων μετάπτωσης (Fe^{2+} , Cu^{2+})

Είναι γνωστό ότι τα αρωματικά περιέχουν σημαντικές ποσότητες φυτοχημικών, πολλά από τα οποία εκδηλώνουν ικανότητα σύμπλεξης με κατιόντα μετάλλων (*Karavoltzos et al., 2014*). Στην παρούσα ενότητα, έγινε προσδιορισμός της ικανότητας του αφεψήματος από

Μελισσόχορτο να δημιουργεί χηλικά σύμπλοκα με τα κατιόντα σιδήρου (Fe^{2+}) και χαλκού (Cu^{2+}), και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.10.

Πίνακας 2.10: Ικανότητα δημιουργίας χηλικών συμπλόκων με κατιόντα μετάλλων μετάπτωσης (Fe^{2+} , Cu^{2+}).

Βότανο	Ικανότητα Σύμπλεξης Fe^{2+} ($\mu\text{mol Fe}^{2+}$ / κούπα 200 mL)	Ικανότητα Σύμπλεξης Cu^{2+} ($\mu\text{mol Cu}^{2+}$ /κούπα 200 mL)
Μελισσόχορτο	7.947	51

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα, το αφέψημα από Μελισσόχορτο έχει την ικανότητα να δημιουργεί χηλικά σύμπλοκα με τα κατιόντα σιδήρου και χαλκού. Μέσω αυτής της χηλικής σύμπλεξης, το αφέψημα από Μελισσόχορτο μπορεί να διατηρεί τα οξειδοαναγωγικά δραστικά μέταλλα σε μια σταθερή κατάσταση οξείδωσης και να αποτρέπει τη συμμετοχή τους σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις προλαμβάνοντας με αυτόν τον τρόπο την επακόλουθη οξειδωτική βλάβη που αυτά μπορούν να επιφέρουν σε διάφορα μακρομόρια (Lü et al., 2010; Jomova et al., 2012). Η ικανότητα σύμπλεξης Fe^{2+} του αφεψήματος υποστηρίζεται και από άλλες μελέτες στις οποίες, μάλιστα, η ικανότητα αυτή εμφανίζει δοσοεξάρτηση (Dastmalchi et al., 2008; Barros et al., 2013).

Η συγκεκριμένη ικανότητα που χαρακτηρίζει πολλά φαρμακευτικά φυτά (Karavoltzos et al., 2014) παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον από ιατρική άποψη, καθώς έχει αποδειχθεί ότι τα ιόντα των μετάλλων μετάπτωσης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην οξειδωτική βλάβη που παρατηρείται σε νευροεκφυλιστικές παθήσεις όπως η νόσος του Alzheimer και του Parkinson (Bush, 2003; Dairam et al., 2008). Επομένως, φυτά που επιδεικνύουν τέτοια δράση θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην αντιμετώπιση των παραπάνω παθήσεων, απαιτείται, ωστόσο, η διεξαγωγή *in vivo* μελετών προκειμένου να επιβεβαιωθεί κάτι τέτοιο (Dastmalchi et al., 2008). Επιπρόσθετα, η ικανότητα αυτή θα μπορούσε να αξιοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό από τη βιομηχανία τροφίμων όπου η παρουσία των κατιόντων μετάλλων αποτελεί βασικό παράγοντα υποβάθμισης των τροφίμων λόγω της συμμετοχής του στην κατάλυση της έναρξης και της διάσπασης των υδροϋπεροξειδίων και της οξείδωσης των λιπιδίων (Antolovich et al., 2002).

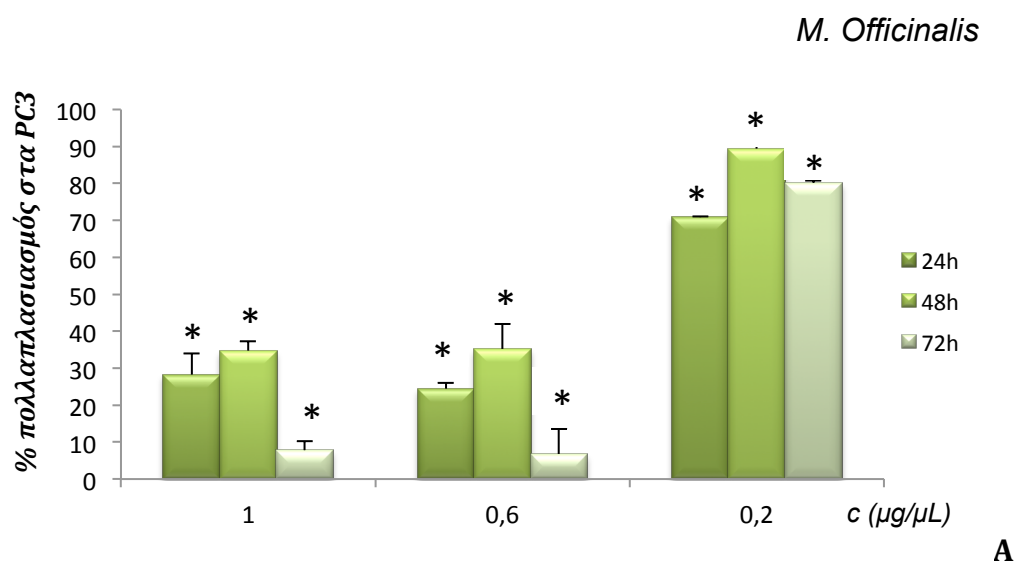
Η ικανότητα συστατικών του Μελισσόχορτου να σχηματίζουν χηλικά σύμπλοκα έχει αναφερθεί σε αρκετές μελέτες. Το καφεϊκό οξύ έχει φανεί ότι μπορεί να συμπλέκει τα κατιόντα σιδήρου συμβάλλοντας στην αναστολή της οξείδωσης των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (Gulcin, 2006). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και σε μια

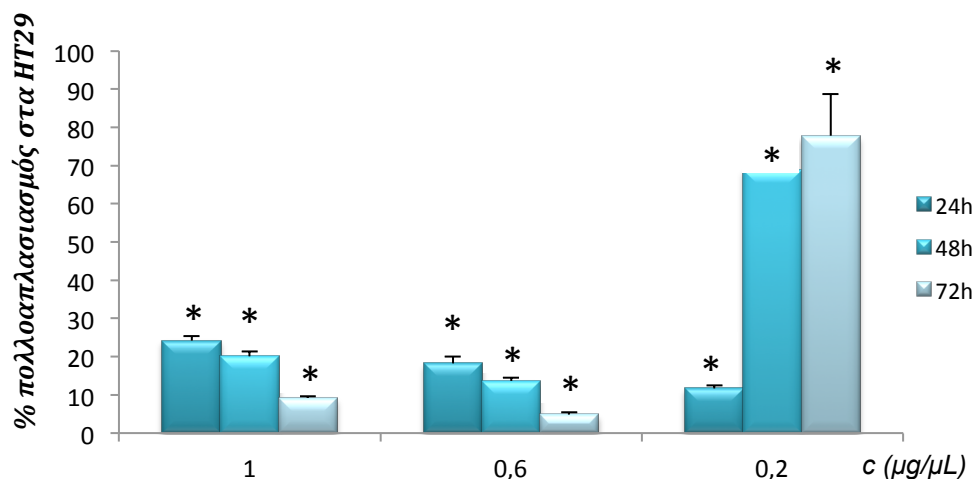
άλλη μελέτη σύμφωνα με την οποία το καφεϊκό, το ροσμαρινικό, το πρωτοκατεχικό και το χλωρογενικό οξύ παρουσιάζουν ικανότητα σύμπλεξης με ιόντα χαλκού ενώ μπορούν να σχηματίζουν και σύμπλοκα με τα κατιόντα σιδήρου με εξαίρεση το πρωτοκατεχικό οξύ (Psotová et al., 2003).

3.3 Βιολογικές Δοκιμές

3.3.1 Μελέτη της επίδρασης του αφεψήματος στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυτταρικών σειρών HT-29 και PC-3

Στο ακόλουθο διάγραμμα (Διάγραμμα 3.1) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης του αφεψήματος από Μελισσόχορτο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των σειρών HT-29 και PC-3 σε συνάρτηση με το χρόνο/ διάρκεια επίδρασης (24, 48 και 72h) και τη συγκέντρωση (1, 0,6 και 0,2μg/μL) του αφεψήματος.



**B**

Διάγραμμα 3.1: Επίδραση του αφεψήματος στον πολλαπλασιασμό των PC-3 και HT-29 καρκινικών κυττάρων. Ο (*) υποδηλώνει την ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς ($p < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δεν έγινε επίδραση με το αφέψημα και για τα οποία θεωρήθηκε ότι ο πολλαπλασιασμός/βιωσιμότητα ήταν 100% και εκείνων που επώαστηκαν με το αφέψημα για 24, 48 και 72h σε συγκεντρώσεις 1, 0.6 και 0.2µg/µL. Οι τιμές είναι οι $\mu.o \pm SD$ πέντε πειραμάτων.

Το διάγραμμα Α αφορά την καρκινική κυτταρική σειρά PC3 και απεικονίζει την ικανότητα των κυττάρων να πολλαπλασιάζονται παρουσία τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων του αφεψήματος από Μελισσόχορτο έπειτα από επώαση για 24, 48 και 72 ώρες. Όπως γίνεται φανερό από το διάγραμμα, μετά από 24 ώρες επώαση με το αφέψημα στη μικρότερη συγκέντρωση (0.2µg/µL) η ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να πολλαπλασιάζονται, συγκριτικά πάντα με το control που χαρακτηρίζεται από 100% ικανότητα πολλαπλασιασμού και στο οποίο δεν έχει γίνει επίδραση με το αφέψημα, μειώνεται περίπου κατά 30% ενώ αναστολή του πολλαπλασιασμού παρατηρείται και μετά από επώαση για 48 και 72 ώρες κατά τις οποίες τα ποσοστά αναστολής είναι 10% και 20% αντίστοιχα. Συνεχίζοντας με την ενδιάμεση συγκέντρωση (0.6µg/µL), φαίνεται ότι η συγκεκριμένη συγκέντρωση παρουσιάζει μεγάλη δραστηριότητα καθώς ήδη από τις 24 ώρες επώαση η ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων μειώνεται σε ποσοστό περίπου 78-80%, δηλαδή τα κύτταρα έχουν ικανότητα πολλαπλασιασμού περίπου 20%, και η μείωση αυτή είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$). Στις 48 ώρες, η μείωση που σημειώνεται φτάνει σε ποσοστό 65% ενώ στις 72 ώρες παρατηρείται η μεγαλύτερη αναστολή που ανέρχεται σε ποσοστό 95% και είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$). Όσον αφορά τη μεγαλύτερη συγκέντρωση που μελετήθηκε (1µg/µL), η μεγαλύτερη μείωση στην ικανότητα πολλαπλασιασμού σημειώνεται μετά την επώαση για 72 ώρες και φτάνει σε

ποσοστό 95%, με το αποτέλεσμα αυτό να είναι στατιστικά σημαντικό ($p < 0.05$). Ωστόσο, και στις 24 και 48 ώρες παρατηρείται αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, η οποία είναι μικρότερη συγκριτικά με τις 72 ώρες. Πιο συγκεκριμένα, μετά το πέρας των 24 ωρών η ικανότητα πολλαπλασιασμού μειώνεται κατά 75% περίπου ενώ μετά τις 48 ώρες επώασης η μείωση είναι περίπου 65% ($p < 0.05$).

Το διάγραμμα Β απεικονίζει την επίδραση του αφεψήματος στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της καρκινικής σειράς HT-29. Ξεκινώντας από τη μικρότερη συγκέντρωση (0.2μg/μL), η μεγαλύτερη αναστολή του πολλαπλασιασμού παρατηρείται έπειτα από τις 24 ώρες επώασης με το αφέψημα από Μελισσόχορτο και φτάνει σε ποσοστό περίπου 88% ($p < 0.05$). Στις 48 ώρες επώασης η ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων μειώνεται κατά 30% ενώ στις 72 ώρες ο πολλαπλασιασμός αναστέλλεται μόνο κατά 20% περίπου από το αφέψημα. Στην ενδιάμεση συγκέντρωση (0.6μg/μL), η ικανότητα του αφεψήματος να αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό παρουσιάζει χρονο-εξάρτηση, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα. Στις 24, 48 και 72 ώρες τα αντίστοιχα ποσοστά αναστολής του πολλαπλασιασμού είναι 81%, 85% και 95% αντίστοιχα και είναι στατιστικά σημαντικά ($p < 0.05$). Τέλος, όσον αφορά την επίδραση της μεγαλύτερης συγκέντρωσης (1μg/μL) στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού γίνεται φανερό ότι παρουσιάζει, επίσης, χρονο-εξάρτηση, καθώς η αναστολή που προκαλείται αυξάνεται όσο αυξάνεται και ο χρόνος επώασης με το αφέψημα. Ειδικότερα, έπειτα από επώαση για 24 ώρες με το αφέψημα η ικανότητα πολλαπλασιασμού μειώνεται κατά 75% και η μείωση είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$). Μετά το πέρας των 48 ωρών ο πολλαπλασιασμός αναστέλλεται σε ακόμα μεγαλύτερο βαθμό καθώς η αναστολή φτάνει σε ποσοστό 80% ενώ μετά την ολοκλήρωση και των 72 ωρών η αναστολή που σημειώνεται είναι 90% ($p < 0.05$), δηλαδή τα καρκινικά κύτταρα HT-29 έχουν μόλις 10% ικανότητα να πολλαπλασιάζονται.

Η απορρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού αποτελεί ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά της καρκινογένεσης. Στα φυσιολογικά κύτταρα, ο πολλαπλασιασμός ρυθμίζεται από την ισορροπία που υπάρχει ανάμεσα στα σήματα ανάπτυξης και στα σήματα καταστολής της. Ωστόσο, τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν την ικανότητα να παράγουν τα δικά τους σήματα ανάπτυξης με αποτέλεσμα να μη χαρακτηρίζονται από ευαισθησία στα κυτταρικά σήματα που την καταστέλλουν (*Gupta et al., 2010*).

Η ικανότητα του Μελισσόχορτου αλλά και μεμονωμένων συστατικών του να επιδρούν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και να τον αναστέλλουν έχει αναφερθεί σε αρκετές

μελέτες. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός που μεσολαβεί αυτήν την επίδραση δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως και δεν είναι ο ίδιος για όλα τα βιοδραστικά συστατικά. Πιο συγκεκριμένα, για το Μελισσόχορτο, έχουν γίνει πολλές αναφορές στη βιβλιογραφία για την ικανότητά του να αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε πολλές καρκινικές σειρές. Στις διάφορες μελέτες οι ερευνητές αναφέρονται στο αιθέριο έλαιο του φυτού, στο μεθανολικό του εκχύλισμα, στο υδατικό του εκχύλισμα ή στο εκχύλισμα που έχει παραληφθεί με τη χρήση μίγματος από διαλύτες, για παράδειγμα αιθανόλης/νερού.

Οι *de Sousa* και συνεργάτες του απέδειξαν σε μια μελέτη τους ότι το αιθέριο έλαιο από Μελισσόχορτο είναι σε θέση να προκαλεί αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στις καρκινικές κυτταρικές σειρές A549, MCF-7, Caco-2, HL-60 και K562. Η αναστολή αυτή συσχετίστηκε με την αντιοξειδωτική του ικανότητα και οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το αιθέριο έλαιο από Μελισσόχορτο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως αντικαρκινικός παράγοντας (*de Sousa et al., 2004*). Άλλοι ερευνητές αναφέρονται στην ικανότητα εκχυλισμάτων/αφεψημάτων από Μελισσόχορτο να αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ήδη από τις 24 ώρες επώασης (επώαση για 24, 48 και 72 ώρες σε διάφορες συγκεντρώσεις) στις καρκινικές σειρές HeLa και MCF-7 (*Canadanovic-Brunet et al., 2008*) αλλά και στην HCT-116, στην οποία η αναστολή παρατηρείται και από ένα μεμονωμένο συστατικό του Μελισσόχορτου, το ροσμαρινικό οξύ (*Encalada et al., 2011*). Επιπλέον της αντιοξειδωτικής ικανότητας του εκχυλίσματος του βοτάνου, άλλοι μηχανισμοί που παρατηρήθηκαν αργότερα από άλλους ερευνητές και που προτάθηκαν για τη μεσολάβηση της σημειωθείσας αναστολής σε καρκινικά κύτταρα του μαστού και κύτταρα λευχαιμίας ήταν η ενεργοποίηση αποπτωτικών γεγονότων, όπως η ενεργοποίηση κασπασών και η θραυσματοποίηση του DNA (*Saraydin et al., 2012; Ebrahimnezhad Darzi & Amirghofran, 2013*).

Σε μια πολύ πρόσφατη μελέτη, οι ερευνητές παρατήρησαν, ότι η επώαση HT-29 και T84 κυττάρων με εκχύλισμα διαφόρων συγκεντρώσεων από Μελισσόχορτο (μίγμα διαλυτών: αιθανόλη/νερό) για 72 και 96 ώρες οδήγησε σε ολική αναστολή (100%) του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Επιπρόσθετα, παρατήρησαν ότι η επώαση των HT-29 κυττάρων με το εκχύλισμα είχε ως αποτέλεσμα τη δράση του ως προ-οξειδωτικό παρά ως αντιοξειδωτικό καθώς οδήγησε στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών τόσο στο εσωτερικό όσο και στο εξωτερικό περιβάλλον των HT-29 κυττάρων. Οι ελεύθερες ρίζες που σχηματίστηκαν, εξαλείφθηκαν πλήρως έπειτα από σύγχρονη επώαση των κυττάρων με αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως η γλουταθειόνη (GSH) και η N-ακετυλο-

κυστεΐνη. Οι ερευνητές υποστήριξαν ότι τα υψηλά επίπεδα ελευθέρων ριζών ήταν απαραίτητα για την εκδήλωση της ανασταλτικής και αποπτωτικής δράσης του εκχυλίσματος από Μελισσόχορτο (*Weidner et al., 2015*).

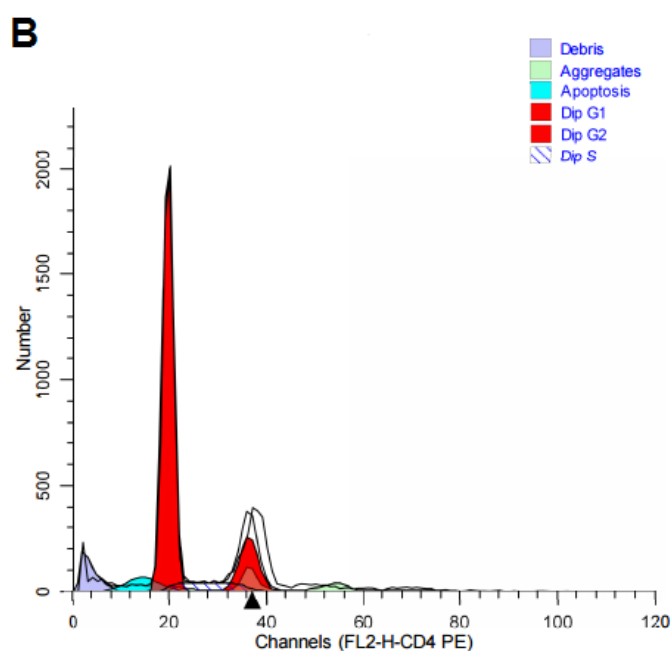
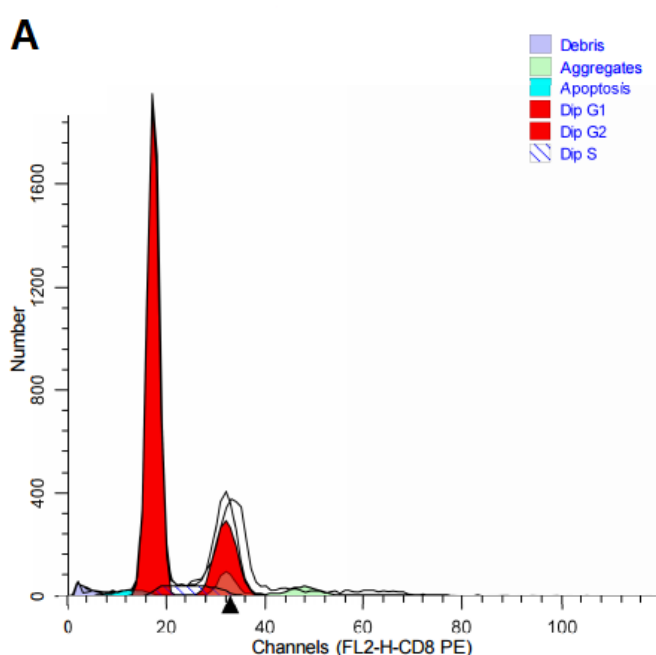
Δεδομένα υπάρχουν και για άλλα επιμέρους συστατικά του Μελισσόχορτου όπως είναι τα τερπενοειδή ουρσολικό και ολεανολικό οξύ. Όταν μελετήθηκε η επίδρασή τους (1μμοL/L) στις καρκινικές κυτταρικές σειρές KBM-5, U937 και Jurkat, φάνηκε ότι μπορούν να τροποποιούν τη δραστηριότητα του μεταγραφικού NF-κΒ μέσω αναστολής της κινάσης ΙκΒα και να οδηγούν σε αναστολή της έκφρασης των γονιδίων που ρυθμίζονται από τον NF-κΒ και τα οποία εμπλέκονται στις διαδικασίες του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης (*Shishodia et al., 2006*). Αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε καρκινικές σειρές του προστάτη (LNCaP, DU145 και PC3) φάνηκε να προκαλεί και το καφεϊκό οξύ και μάλιστα με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο, μέσω επίδρασης σε πρωτεϊνικές κινάσες (PKC/Akt, ERK) αλλά και στους υποδοχείς οιστρογόνων (ER-α και -β) (*Tolba et al., 2013; Lin et al., 2013*). Επιπλέον, η επώαση PC3 κυττάρων με το φαινολικό εστέρα του καφεϊκού οξέος (CAPE) οδήγησε σε αναστολή του πολλαπλασιασμού, του σχηματισμού αποικιών αλλά και του κυτταρικού κύκλου (*Lin et al., 2012*). Ακόμη, η κιτράλη, ένα άλλο συστατικό του Μελισσόχορτου, έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να αναστείλει αποτελεσματικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό MCF-7 και HL-60 κυττάρων ειδικά μετά τις 48 και 72 ώρες επώασης (*Hata et al., 2003; Chaouki et al., 2009*). Παρόμοια δεδομένα υπάρχουν και για τη λουτεολίνη, την καρνοσόλη και το καρνοσικό οξύ, τα οποία επάγουν την αναστολή του πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων σε πολλές καρκινικές σειρές κυρίως μέσω επίδρασης στον κυτταρικό κύκλο (*Ko et al., 2002; Lin et al., 2008; López-Jiménez et al., 2013*).

Αναστολή του πολλαπλασιασμού (μείωση της βιωσιμότητας) με δοσοεξαρτώμενο τρόπο προκάλεσε και το πρωτοκατεχικό οξύ σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη (LNCaP), του μαστού, των πνευμόνων, του ήπατος και του τραχήλου της μήτρας (*Yin et al., 2009*). Τέλος, η καρβακρόλη μεμονωμένα ή το μίγμα καρβακρόλης/ θυμόλης εκδηλώνει κυτταροτοξικότητα στα καρκινικά κύτταρα Caco-2 και αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με δοσο-και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο σε όλες τις φάσεις της καρκινογένεσης (*Llana-Ruiz-Cabello et al., 2014*).

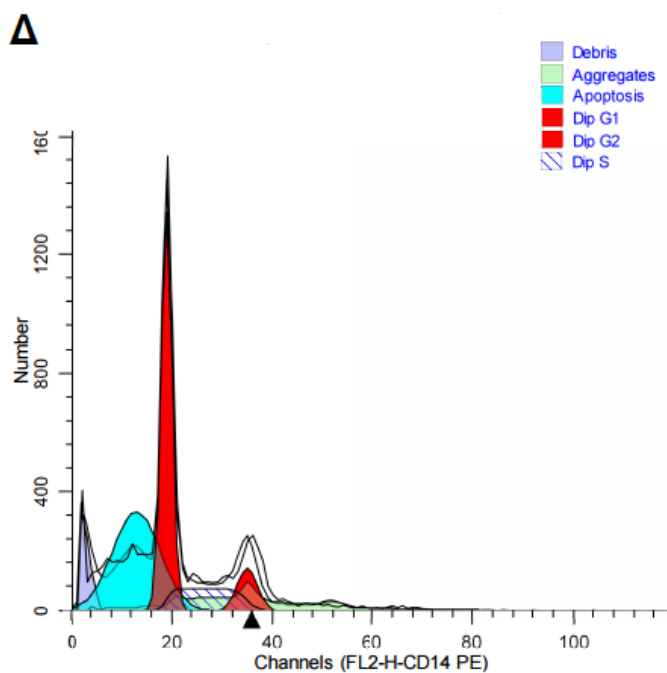
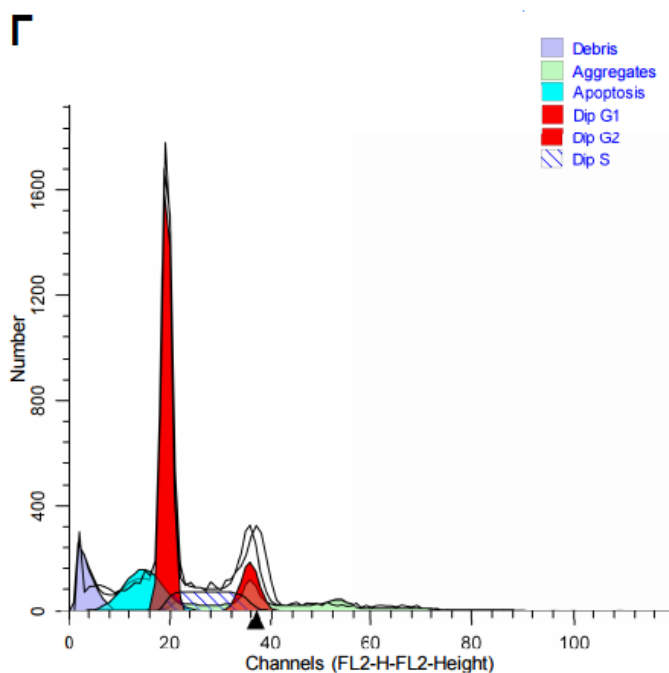
3.3.2 Μελέτη της επίδρασης του αφυδατωμένου αφεψήματος στον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση με τη μέθοδο FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting)

Προκειμένου να ερμηνευθεί η ικανότητα του αφεψήματος να αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μελετήθηκε περαιτέρω η επίδρασή του στον κυτταρικό κύκλο και τη διαδικασία της απόπτωσης με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Στα διαγράμματα 3.5 και 3.6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τα δείγματα control και τα δείγματα στα οποία έγινε επίδραση με το αφέψημα

Μελισσόχορτου σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις για τρεις διαφορετικούς χρόνους- 24, 48 και 72 ώρες- στις καρκινικές κυτταρικές σειρές PC3 και HT-29.



Στο Διάγραμμα 3.2 απεικονίζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την κυτταρομετρία ροής για τα PC3 κύτταρα του προστάτη (μετά από 72 ώρες επώασης) και στον Πίνακα 3.11 παρουσιάζεται ο μέσος όρος κατανομής των κυττάρων στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Όπως γίνεται φανερό, όσο περνάει ο χρόνος οι control καλλιέργειες των κυττάρων συγκεντρώνονται στη φάση G0/G1 εξαιτίας της αναστολής που προκαλείται στον πολλαπλασιασμό λόγω επαφής των κυττάρων με ποσοστά 54.37, 64.38 και 70.26% για τις 24, 48 και 72 ώρες αντίστοιχα. Τα κύτταρα, δηλαδή, προσωρινά δεν εισέρχονται στη φάση G1 που θα τα προετοιμάσει για την επόμενη διαίρεση



Διάγραμμα 3.2 : Δοσο-εξαρτώμενη επίδραση του αφεψήματος από Μελισσόχορτο στον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση των **PC-3** κυττάρων έπειτα από επώαση **72h** (A: control, B: 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Γ: 0.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Δ: 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

περιπτώσεις που η σχέση δοσοεξάρτησης δεν είναι προφανής, όπως μετά τις 24 ώρες επώασης, ενδέχεται να έχει επιτευχθεί plateau ήδη από την ενδιάμεση συγκέντρωση (0.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) καθώς το ποσοστό απόπτωσης που σημειώθηκε ήταν σημαντικά υψηλό

είτε επειδή η επιφάνεια του τρυβλίου στην οποία καλλιεργούνται έχει καλυφθεί πλήρως και τα κύτταρα βρίσκονται σε άμεση επαφή είτε επειδή επικρατούν συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών, αυξητικών, μιτογόνων ή άλλων παραγόντων (Borel et al., 2002). Παρατηρώντας τα ποσοστά απόπτωσης των PC3 κυττάρων στα οποία έχει γίνει επίδραση με το αφέψημα Μελισσόχορτου γίνεται αντιληπτό ότι το αφέψημα προκαλεί απόπτωση με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, καθώς όσο αυξάνεται η συγκέντρωση με την οποία έγινε η επίδραση τόσο αυξάνεται και το ποσοστό των κυττάρων που οδηγούνται σε απόπτωση, ειδικά μετά από επώαση για 48 και 72 ώρες. Όσον αφορά στις 48 ώρες επώασης, τα ποσοστά απόπτωσης που σημειώνονται είναι 6.78, 8.10 και 16.44% για τις συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ αντίστοιχα, ενώ για τις 72 ώρες τα αντίστοιχα ποσοστά είναι 6.02, 15.93 και 30.58%. Το μεγαλύτερο ποσοστό απόπτωσης σημειώνεται μετά την επίδραση του αφεψήματος για 72 ώρες στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) και είναι 30.58%. Αξίζει να σημειωθεί ότι ακόμα και στις

(22.08%). Ακόμη, τα ποσοστά απόπτωσης που προέκυψαν για τη μεγαλύτερη συγκέντρωση που μελετήθηκε παρουσίασαν και χρονοεξάρτηση, καθώς αυξάνονταν όσο μεγαλύτερη ήταν η διάρκεια επώασης με το αφέψημα (11.94, 16.44 και 30.58% για τις 24, 48 και 72 ώρες αντίστοιχα).

Πίνακας 3.11: Μέσος Όρος Κατανομής των PC-3 κυττάρων στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Δοσο- & χρονο-εξαρτώμενη επίδραση του αφεψήματος στον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση.

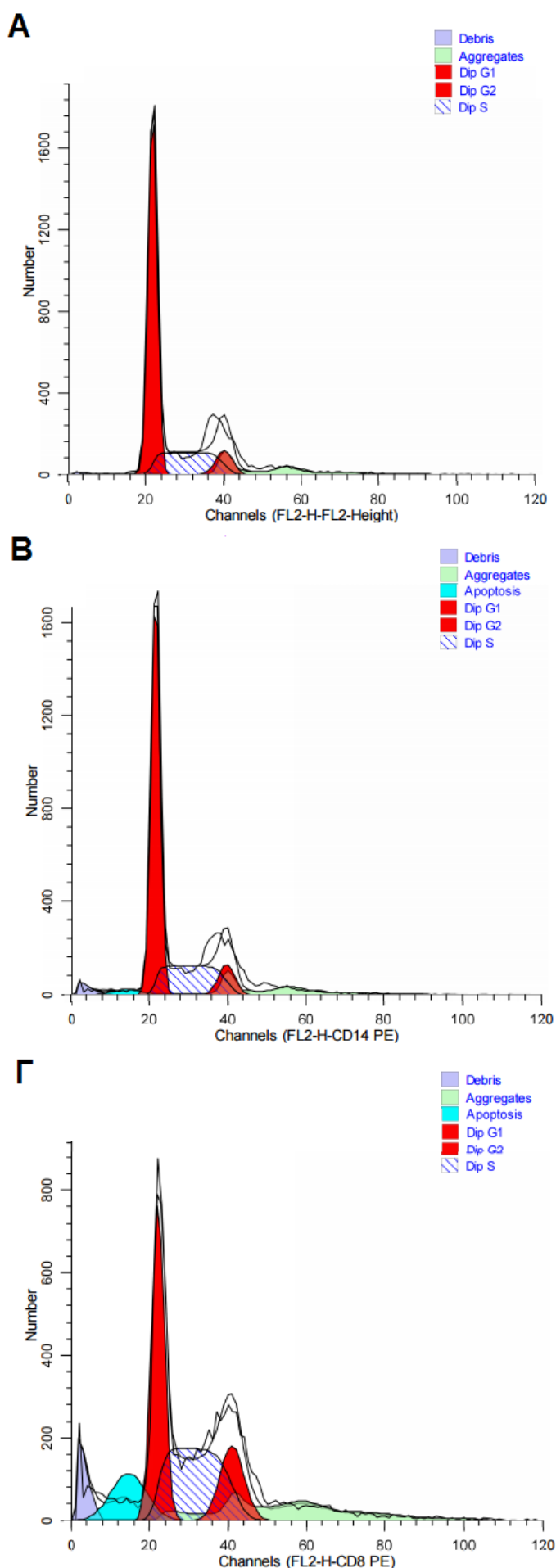
		Μέσος Όρος (%)			
	Δείγματα	G0/G1	S	G2/M	Απόπτωση
Χρόνος	Συγκέντρωση				
24	control	54.37	23.24	22.40	6.19
24	1 µg/µL	58.10	22.18	19.72	11.94
24	0.6 µg/µL	63.48	17.30	19.24	22.08
24	0.2 µg/µL	59.39	22.57	18.05	3.29
48	control	64.38	12.82	22.80	2.82
48	1 µg/µL	53.17	28.89	17.94	16.44
48	0.6 µg/µL	61.69	20.61	17.70	8.10
48	0.2 µg/µL	66.93	12.05	21.03	6.78
72	control	70.26	9.13	20.63	3.10
72	1 µg/µL	60.37	25.59	14.05	30.58
72	0.6 µg/µL	69.66	16.65	13.70	15.93
72	0.2 µg/µL	74.40	8.90	16.70	6.02

Παράλληλα, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων παρατηρείται ότι το αφέψημα προκαλεί συγκέντρωση των κυττάρων στη φάση S συγκριτικά με τη συγκέντρωση στη φάση G2/M και δεδομένου ότι προκαλεί απόπτωση σε σημαντικά ποσοστά, εξάγεται το συμπέρασμα ότι πιθανά πρόκειται για αναστολή στη φάση S (S-phase block) και όχι για διέγερση του πολλαπλασιασμού. Ανάλογα αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί και για την αδιφικολίνη. Σύμφωνα με τους ερευνητές, κατά τη διάρκεια της φάσης S, η αντιγραφή μπορεί να διακοπεί ως απόκριση του κυττάρου σε βλάβη του DNA ή σε συνθήκες στρες που δημιουργήθηκαν κατά τη διαδικασία της αντιγραφής. Τέτοιου τύπου στρες επάγεται από ορισμένα φάρμακα όπως η αδιφικολίνη και η υδροξυ-ουρία, τα οποία παρεμβαίνουν στη διαδικασία έναρξης της αντιγραφής χωρίς, όμως, να επιφέρουν βλάβη στο DNA. Πιο συγκεκριμένα, προκαλούν διακοπή της διαδικασίας μέσω μηχανισμών που διαφέρουν από εκείνους που ενεργοποιούνται σε καταστάσεις βλάβης του γενετικού υλικού.

Σε φυσιολογικές συνθήκες τα κύτταρα εκκινούν ξανά τη διαδικασία της αντιγραφής άμεσα και οδεύουν προς τη φάση της μίτωσης (G2/M). Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις τα κύτταρα αδυνατούν να εκκινήσουν πάλι την αντιγραφή και παραμένουν

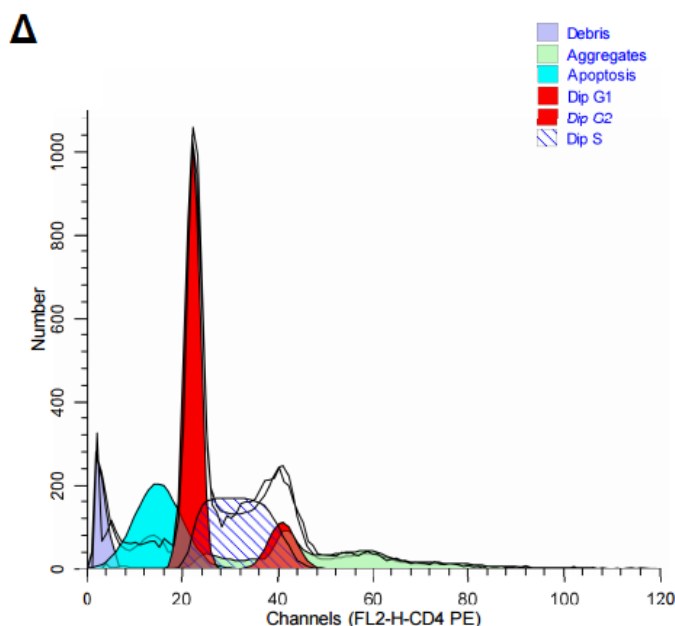
«παγιδευμένα» στη φάση S για χρονικό διάστημα διάρκειας τουλάχιστον ενός κυτταρικού κύκλου. Αξίζει να σημειωθεί ότι η διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση S δεν εξαρτάται από τους αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών, p21 και p27. Στην περίπτωση παρατεταμένης και μόνιμης διακοπής του κύκλου στη φάση S, η έναρξη της αντιγραφής καταστέλλεται πιθανά ως απόκριση στη μερική μετατόπιση ή τη μη αναστρέψιμη απώλεια των πρωτεϊνών MCM (πρωτεΐνες απαραίτητες για τη ρύθμιση της προετοιμασίας της αντιγραφής κατά τη φάση G1). Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία ενός σταθερού και στατικού πληθυσμού κυττάρων, που φέρει μόνο μικρή ικανότητα (από ένα μικρό ποσοστό των κυττάρων) διπλασιασμού και διαίρεσης, ενώ είναι αδύνατη η επιστροφή και στη φάση ηρεμίας (G0). Οι ερευνητές συμπέραναν, ότι η παρατεταμένη παραμονή των κυττάρων στη φάση S, είναι αποτέλεσμα ενεργής και διαρκούς αναστολής της ανάκτησης της ικανότητας για προαγωγή της φάσης S και όχι ολικής απώλειας της ικανότητας πολλαπλασιασμού. Παρατήρησαν, επίσης, ότι τα κύτταρα, παρόλο που παραμένουν σε αυτήν την κατάσταση αναστολής, διατηρούνται μεταβολικά στη φάση S. Αναφέρουν, επίσης, ότι μια εναλλακτική των κυττάρων μετά από παρατεταμένη παραμονή στη φάση S και έπειτα από ατελή αντιγραφή, είναι να οδηγηθούν ταχύτατα σε απόπτωση, όπως συνέβη με τα κύτταρα HeLa που συμπεριέλαβαν στη μελέτη τους (*Borel et al., 2002*).

Ακολούθως παρατίθενται τα διαγράμματα (Διάγραμμα 3.3) που αφορούν στην επίδραση του αφεψήματος στον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση στα HT-29 κύτταρα μετά από 72 ώρες επώασης.



Τα αποτελέσματα για τα HT-29 κύτταρα του παχέος εντέρου είναι παρόμοια με αυτά που περιγράφηκαν παραπάνω για τα PC3 κύτταρα. Και σε αυτήν την κυτταρική σειρά, το αφέψημα είναι σε θέση να επάγει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Συγκεκριμένα, τα ποσοστά από τη μικρότερη (0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) προς τη μεγαλύτερη συγκέντρωση (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) είναι 6.02, 6.41 και 13.61% για τις 48 ώρες και 2.43, 10.84 και 19.74% για τις 72 ώρες αντίστοιχα. Το μεγαλύτερο ποσοστό απόπτωσης (19.74%) επιτυγχάνεται και πάλι μετά από την επώαση των HT-29 κυττάρων με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση για 72 ώρες, ενώ για τη συγκέντρωση αυτή το ποσοστό απόπτωσης αυξάνεται σε συνάρτηση με το χρόνο, εμφανίζει, δηλαδή, σχέση χρονοεξάρτησης.

Συγκρίνοντας τα ποσοστά απόπτωσης που προέκυψαν για τις δυο κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν, προκύπτει ότι το αφέψημα επάγει την απόπτωση των PC3 κυττάρων του προστάτη σε μεγαλύτερο ποσοστό (30.58% έναντι 19.74%). Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να σχετίζεται με το γεγονός ότι το αφέψημα λόγω των επιμέρους βιοδραστικών συστατικών, τα οποία



Διάγραμμα 3.3 : Δοσο-εξαρτώμενη επίδραση του αφεψήματος από Μελισσόχορτο στον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση των **HT-29** κυττάρων έπειτα από επώαση **72h** (A: control, B: 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Γ: 0.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Δ: 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

ενδέχεται να εκδηλώνουν και συνεργιστική δράση, εκδηλώνει την αποπτωτική του δράση με επιλεκτικό τρόπο, δηλαδή μπορεί να επιδρά με διαφορετικό τρόπο και μηχανισμό σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων επιφέροντας και διαφορετικά αποτελέσματα (Ramos, 2007).

Πίνακας 3.12: Μέσος Όρος Κατανομής των **HT-29** κυττάρων στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Δοσο- & χρονο-εξαρτώμενη επίδραση του αφεψήματος στον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση.

		Μέσος Όρος (%)			
Δείγματα		G0/G1	S	G2/M	Απόπτωση
Χρόνος	Συγκέντρωση				
24	control	45.05	37.47	17.48	0.57
24	1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	43.65	48.05	8.30	10.03
24	0.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	37.40	52.28	10.33	11.68
24	0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	49.37	37.41	13.22	2.90
48	control	60.42	29.10	10.49	2.18
48	1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	42.54	45.00	12.47	13.61
48	0.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	43.77	41.49	14.75	6.41
48	0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	61.12	30.13	8.76	6.02
72	control	72.62	21.19	6.20	2.18
72	1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	51.03	39.01	9.96	19.74
72	0.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	44.30	41.54	14.17	10.84
72	0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	73.95	20.18	5.88	2.43

Σε μια πρόσφατη μελέτη, ο *Weidner* και συνεργάτες του απέδειξαν ότι η επώαση HT-29 κυττάρων με υδρο-αιθανολικό εκχύλισμα από Μελισσόχορτο (600 $\mu\text{g}/\text{mL}$) για 24 και 48 ώρες, οδήγησε στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M με ταυτόχρονη

μείωση του ποσοστού των κυττάρων που συσσωρεύτηκαν στις φάσεις G0/G1 και S. Το αφέψημα επέδρασε στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου μέσω της μείωσης της έκφρασης των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDK) 2, 4 και 6 και της κυκλίνης D3 και της ταυτόχρονης αύξησης της έκφρασης των αναστολέων 2C (p18) και 1A (p21) των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών. Επιπλέον, η επώαση των κυττάρων με το αφέψημα για 48 ώρες είχε σαν αποτέλεσμα την εκδήλωση προ-αποπτωτικής δράσης καθώς προκάλεσε τη διάσπαση/μετατροπή των προ-κασπασών 3 και 7 στις αντίστοιχες κασπάσες, υποδηλώνοντας την ενεργοποίηση της απόπτωσης. Στην ίδια μελέτη, οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι υπεύθυνη για την αναστολή που προκλήθηκε στον πολλαπλασιασμό αλλά και για την εκδήλωση προ-αποπτωτικής δράσης ήταν η ενδοκυτταρική αύξηση των επιπέδων των ελευθέρων ρίζων (ROS) που προκλήθηκε μετά την επίδραση του αφεψήματος (*Weidner et al., 2015*).

Όπως αναφέρεται σε μια μελέτη, η καρνοσόλη ήταν σε θέση να διακόπτει τον κυτταρικό κύκλο και να προκαλεί συσσώρευση των Caco-2 καρκινικών κυττάρων στη φάση G2/M και αύξηση της έκφρασης της κυκλίνης B1, αναστέλλοντας τη διαίρεση τους ενώ, παράλληλα, το καρνοσικό οξύ προκάλεσε μείωση των επιπέδων της κυκλίνης A (*Visanji et al., 2006*). Η λουτεολίνη μελετήθηκε ως προς την επίδρασή της στα HL-60 κύτταρα. Όπως φάνηκε, η ένωση αυτή μπορεί να επιδρά σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος των κυττάρων και να προκαλεί αρνητική ρύθμιση των ERK και Akt, να ενεργοποιεί κασπάσες, να επάγει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, να διασπά τις αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 αλλά και να τροποποιεί τη μιτοχονδριακή μετατόπιση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών Bax/Bak επιδρώντας τόσο στο ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης όσο και στο εξωγενές (*Cheng et al., 2005*).

Η κερκετίνη εκδηλώνει την αντικαρκινική της δράση μέσω αναστολής της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου στη φάση G0/G1 στην οποία συμβάλλει η αναστολή της Cdk ενώ, έχει αναφερθεί, επίσης, η ικανότητά της να προκαλεί αρνητική ρύθμιση στις αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl_{XL} αλλά και στο ογκογονίδιο Ras, με παράλληλη θετική ρύθμιση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών Bax και ενεργοποίηση της κασπάσης 3 σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη (PC3) σε συγκεντρώσεις 50 και 100 $\mu\text{mol/L}$ μετά από 24 ώρες επώασης αλλά και σε κύτταρα του παχέος εντέρου (HT-29- 50 $\mu\text{mol/L}$) μετά από 72 ώρες επώασης (*Cragg & Newman, 2005; Kim et al., 2005; Vijayababu et al., 2005; Johnson, 2007; Cimino et al., 2012*). Σε χαμηλές συγκεντρώσεις η ένωση αυτή μπορεί να ενεργοποιεί το μονοπάτι των MAPK, JNK και p38 οδηγώντας στην έκφραση γονιδίων επιβίωσης,

ογκοκατασταλτικών γονιδίων και γονιδίων που κωδικοποιούν αμυντικά ένζυμα ή άλλες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον αμυντικό μηχανισμό του οργανισμού ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις ενεργοποιεί το μονοπάτι των κασπασών επάγοντας την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων (*Spencer et al., 2003; van Erk et al., 2005; Ramos, 2007*).

Ακόμη, το πρωτοκατεχικό οξύ (1, 2, 4,8 $\mu\text{mol/L}$) μπορεί να αυξάνει τη δραστηριότητα της κασπάσης 3 και να ενισχύει τη θραυσματοποίηση του DNA επάγοντας με αυτόν τον τρόπο την απόπτωση σε πέντε καρκινικές κυτταρικές σειρές (LNCaP, MCF7, HeLa, HepG2, A549) με δοσοεξαρτώμενο τρόπο (*Yin et al., 2009*). Επίσης, το πρωτοκατεχικό οξύ μπορεί να αυξήσει τον αριθμό των καρκινικών κυττάρων στη φάση G1 οδηγώντας τα στην απόπτωση (*Tanaka et al., 2011*). Επιπλέον, τα υδροξυ-κινναμωμικά οξέα, καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, χλωρογενικό οξύ και p-κουμαρικό οξύ, έχει φανεί ότι επάγουν την απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη (*Ramos, 2007; Szliszka et al., 2011*) ενώ η απιγενίνη συμβάλλει στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, την ενεργοποίηση των κασπασών 3, 7, 8 και 9 και επάγει τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M στις καρκινικές σειρές HL-60, MCF7 και HepG2 (*Ramos, 2007*). Η απιγενίνη προκαλεί, επίσης, θετική ρύθμιση του αναστολέα p21 των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών με επακόλουθη αναστολή της μεταγραφής της κινάσης PLK-1 οδηγώντας τα καρκινικά κύτταρα του προστάτη (PC3) σε απόπτωση (*Seo et al., 2011*).

Η καρβακρόλη αποτελεί ένα ακόμη συστατικό που μπορεί να επάγει την απόπτωση. Όταν μελετήθηκε η επίδρασή της σε δυο καρκινικές σειρές του παχέος εντέρου φάνηκε ότι είναι σε θέση να προκαλεί διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M αλλά και να οδηγεί τα κύτταρα σε απόπτωση με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο (*Kai et al., 2015*). Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα από μια άλλη μελέτη υποστηρίζουν ότι τόσο η καρβακρόλη όσο και το μίγμα καρβακρόλης/θυμόλης μπορούν να επάγουν την αποπτωτική διαδικασία υποδεικνύοντας ότι τα διάφορα φυτοχημικά ενδέχεται να εκδηλώνουν και συνεργιστική δράση (*Llana-Ruiz-Cabello et al., 2014*). Τέλος, το ουρσολικό οξύ σε συγκέντρωση 45-55 μM επάγει την απόπτωση σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του προστάτη (PC3 & LNCaP) (*Kassi et al., 2007*).

3.3.3 Μελέτη της επίδρασης του αφεψήματος στα επίπεδα της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης (GSH)

Η γλουταθειόνη (γ -glutamyl-cysteinyl-glycine, GSH) είναι ένα τριπεπτίδιο μικρού μοριακού βάρους και αποτελεί την πλέον άφθονη μη-πρωτεϊνική θειόλη των

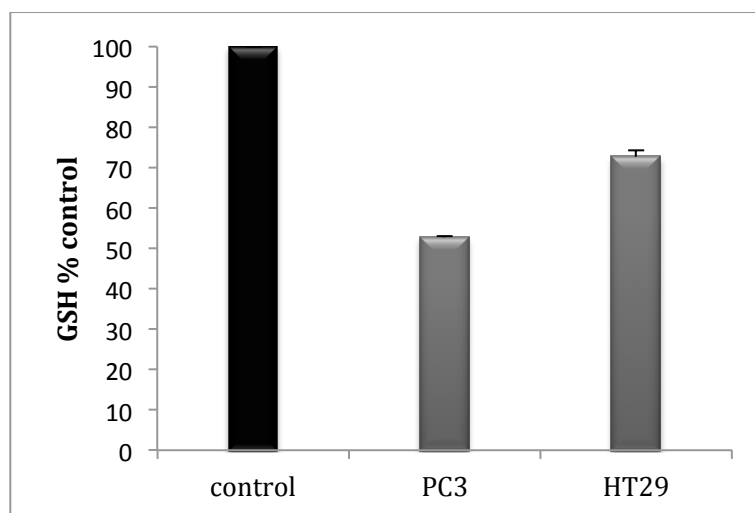
ευκαρυωτικών κυττάρων. Πρόκειται για ένα ενδοκυτταρικό προστατευτικό αντιοξειδωτικό που είναι υπεύθυνο για την υδρόφιλη απομάκρυνση ριζών και ηλεκτρόφιλων μορίων καθώς και για τη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των πρωτεϊνών (*Meng et al., 2010*). Λόγω της υψηλής ενδοκυττάριας συγκέντρωσής της αλλά και του γεγονότος ότι πρόκειται για ένα μόριο που αντιδράει εύκολα, η GSH διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και στη τη ρύθμιση των μηχανισμών της καρκινογένεσης όπως (α) η ευαισθησία στην ιονίζουσα ακτινοβολία, σε ορισμένες κυτταροκίνες και σε διάφορα ξеноβιοτικά, (β) η σύνθεση του DNA και (γ) ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός (*Ortega et al., 2011*). Η *de novo* σύνθεσή της καταλύεται από δυο ATP-εξαρτώμενα κυτταροπλασματικά ένζυμα, τη γ-GCL (λιγάση) και τη συνθάση της GSH (GS).

Σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες και φλεγμονής, δυο καταστάσεις που χαρακτηρίζουν σε μεγάλο βαθμό και τον καρκίνο, τα επίπεδα της ενδοκυττάριας GSH υπόκεινται σε θετική ρύθμιση (*Ortega et al., 2011*). Στα καρκινικά κύτταρα, η GSH βρίσκεται σε αυξημένα επίπεδα συγκριτικά με τα αντίστοιχα φυσιολογικά κύτταρα ως προσαρμοστική απόκριση στις συνθήκες υπερμεταβολισμού που επικρατούν και επιδεικνύει κυρίως προστατευτικό ρόλο (*Kachadourian & Day, 2006*). Συγκεκριμένα, δρα ως παράγοντας που υποβοηθάει στη διαφυγή των καρκινικών κυττάρων από την απόπτωση, τη διατήρηση του φλεγμονώδους μικροπεριβάλλοντος γύρω από τον όγκο, την ικανότητα αποικισμού και την αντίσταση σε φάρμακα και διάφορες μορφές χημειοθεραπείας (*Franco et al., 2009; Ortega et al., 2010*). Στη βιβλιογραφία, αναφέρεται ότι η GSH είναι απαραίτητη για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική επιβίωση. Τα υψηλά επίπεδά της έχουν συσχετισθεί με αντίσταση στην απόπτωση ενώ, αντίθετα, η εξάντληση των επιπέδων της συμβάλλει είτε στην επαγωγή είτε στην ενίσχυση της αποπτωτικής διαδικασίας (*Friesen et al., 2004; Cazanova et al., 2007; Franco & Cidlowski, 2009*).

Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης των επιπέδων της ενδοκυττάριας GSH ρυθμίζοντας την έκφραση του περιοριστικού ενζύμου γ-GCL και κατ' επέκταση τη βιοσύνθεση της (*Peng et al., 2010; Meng et al., 2010*). Στις περισσότερες μορφές καρκίνου, ο NF-κΒ είναι ενεργοποιημένος και εκφράζεται διαρκώς με αποτέλεσμα να συμβάλλει και στη διατήρηση υψηλών επιπέδων GSH, γεγονός δρa προστατευτικά για την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων (*Meng et al., 2010*). Επομένως, ουσίες που είναι σε θέση να μειώσουν σημαντικά τα επίπεδα της GSH, θα μπορούσαν να δράσουν χημειοπροστατευτικά συμβάλλοντας στην αναστολή του

πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων και την επαγωγή της απόπτωσης. Η επίδραση του αφεψήματος Μελισσόχορτου στο % ποσοστό της GSH συγκριτικά με το control μελετήθηκε προκειμένου να ελεγχθεί εάν αποτελεί μηχανισμό μέσω του οποίου επάγεται η απόπτωση, όπως αυτή παρουσιάστηκε στην ενότητα 3.3.2.

Στο Διάγραμμα 3.4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τα επίπεδα της ενδοκυττάριας GSH μετά από την επίδραση του αφεψήματος Μελισσόχορτου για 24 ώρες στις κυτταρικές σειρές PC3 και HT-29.



Διάγραμμα 3.4: Επίδραση του αφεψήματος Μελισσόχορτου στα επίπεδα της ενδοκυττάριας GSH (% του control) στα PC3 και HT-29 καρκινικά κύτταρα μετά από 24h . Ο (*) υποδηλώνει την ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς ($p < 0.05$) συγκριτικά με το control.

Όπως γίνεται φανερό από το διάγραμμα η επίδραση του αφεψήματος στα PC3 και HT-29 κύτταρα οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα ενδοκυττάριας GSH (εκφρασμένα ως % του control) συγκριτικά με το control και τα αποτελέσματα είναι στατιστικά σημαντικά ($p < 0.05$). Όσον αφορά τα HT-29 κύτταρα του παχέος εντέρου, η % μείωση που παρατηρείται στα επίπεδα της γλουταθειόνης με το πέρας των 24 ωρών συγκριτικά με τα αντίστοιχα επίπεδα του control που θεωρούμε ότι αντιστοιχούν στο 100% φτάνει σε ποσοστό το 27,3% ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τα PC3 κύτταρα του προστάτη είναι 48%. Συνεπώς, το αφέψημα φαίνεται να παρουσιάζει μεγαλύτερη επίδραση στα επίπεδα της ενδοκυττάριας GSH στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη. Η μεγαλύτερη επίδραση στη μια από τις δυο κυτταρικές σειρές μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι τα διάφορα βότανα ή τα επιμέρους συστατικά αυτών μπορεί να επιδρούν με διαφορετικό τρόπο και μηχανισμό στους διάφορους τύπους κυττάρων ή στο ότι οι διάφορες κατηγορίες

κυττάρων μπορεί να χαρακτηρίζονται από διαφορετική ευαισθησία ως προς τη δράση συγκεκριμένων παραγόντων.

Οι βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με την επίδραση βοτάνων στα επίπεδα της GSH είναι περιορισμένες και, συνήθως, εστιάζουν στη μελέτη επιμέρους συστατικών τους. Οι *You & Park* μελέτησαν την επίδραση του γαλλικού οξέος στα επίπεδα της ενδοκυττάριας GSH και των ROS σε καρκινικά κύτταρα των πνευμόνων. Αυτό που παρατήρησαν ήταν ότι ενώ αρχικά (στις 2 ώρες επώασης) τα επίπεδα της GSH αυξήθηκαν σημαντικά, στη συνέχεια και μέχρι το πέρας των 24 ωρών, ο αριθμός των κυττάρων που παρουσίασαν εξάντληση της GSH αυξήθηκαν με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Παράλληλα τα επίπεδα των ROS στα καρκινικά κύτταρα σημείωσαν σημαντική αύξηση μετά από 24 ώρες επώαση με το γαλλικό οξύ και πιθανά να οφείλεται σε αυτό η αρχική αύξηση που παρατηρήθηκε στην GSH. Το ποσοστό κυτταρικού θανάτου (απόπτωση) που προκάλεσε το αφέψημα βρέθηκε ότι αυξάνεται όσο μειώνονται τα επίπεδα της GSH (*You & Park, 2010*).

Παρόμοια, σε μια άλλη μελέτη παρατηρήθηκε ότι η επίδραση απιγενίνης (1-40μg/mL) στην καρκινική σειρά T-24 της ουροδόχου κύστης για 24 ώρες οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων των ROS, μείωση των επιπέδων της GSH και τελικά σε απόπτωση. Τα επίπεδα της GSH μετρήθηκαν σε διάφορα χρονικά σημεία και φάνηκε ότι η μείωση τους παρουσίασε χρονο-εξάρτηση (*Shi et al., 2015*). Επιπλέον, οι φλαβόνες χρυσίνη και απιγενίνη (25μM) φάνηκαν ότι είναι σε θέση να προκαλούν 50-70% μείωση των επιπέδων της GSH σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη-PC3- έπειτα από επώαση για 24 ώρες (*Kachadourian & Day, 2006*) ενώ και ο φαινυλ-αιθυλ-εστέρας του καφεϊκού οξέος (CAPE) ήταν ικανός να μειώσει την GSH στα καρκινικά κύτταρα HL-60 (*Chen et al., 2001*).

Συνεπώς, η απόπτωση μπορεί να επάγεται μέσω ενός εσωτερικού μονοπατιού κατά το οποίο αρχικά σημειώνεται αύξηση των ROS αλλά και της GSH προκειμένου να τις απομακρύνει με επακόλουθη εξάντληση των επιπέδων της που, τελικά, ευνοεί την αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων και το θάνατό τους. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα επίπεδα της GSH στο εσωτερικό των καρκινικών κυττάρων είναι πιθανό να εξαρτώνται από το ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων. Η εξάντληση των επιπέδων της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης επιδρά επιλεκτικά στα καρκινικά κύτταρα και όχι στα φυσιολογικά με αποτέλεσμα να μειώνει την άμυνα των κυττάρων αυτών αλλά και την αντίστασή τους σε επαγωγείς οξειδωτικού στρες (ακτινοβολία, κυτταροτοξικά φάρμακα) (*Ortega et al., 2011*). Τα αποτελέσματα της παρούσας ενότητας υποδεικνύουν ότι η μείωση των επιπέδων της ενδοκυττάριας GSH θα μπορούσε να αποτελεί έναν μηχανισμό που

συμβάλλει στην επαγωγή της αποπτωτικής διαδικασίας. Συνεπώς, η χρησιμοποίηση ενώσεων που επιτυγχάνουν παρόμοιο αποτέλεσμα θα μπορούσε να αποτελέσει μια καλή στρατηγική στην αντιμετώπιση του καρκίνου.

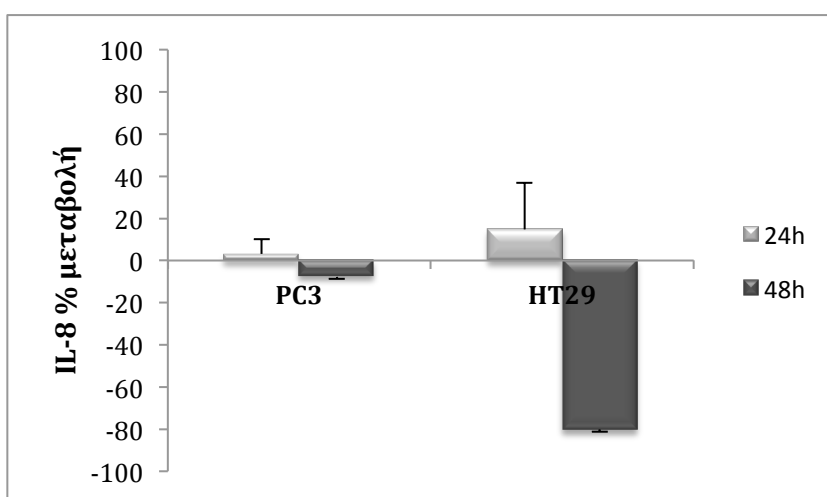
3.3.4 Μελέτη της επίδρασης του αφεψήματος στα επίπεδα της ιντερλευκίνης-8 (IL-8) στις κυτταρικές σειρές HT-29 και PC-3

Όπως αναφέρθηκε στην υποενότητα 1.4.2, η φλεγμονή διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της καρκινογένεσης. Η IL-8 αποτελεί μια προ-φλεγμονώδη χημειοκίνη η οποία επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό το μικροπεριβάλλον του όγκου και ανευρίσκεται αυξημένη τόσο στον καρκίνο του παχέος εντέρου όσο και στον καρκίνο του προστάτη καθώς εκκρίνεται από πολλές κατηγορίες κυττάρων, όταν αυτά διεγερθούν, για παράδειγμα, σε καταστάσεις φλεγμονής, όπως είναι τα επιθηλιακά, τα ενδοθηλιακά και τα μακροφάγα (Brigati et al., 2002; Platz & De Marzo, 2004; Seaton et al., 2008; Begley et al., 2008). Το μόριο αυτό μπορεί να επάγει τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων και η έκφρασή του έχει συσχετισθεί με τις διαδικασίες ανάπτυξης του καρκίνου, την αγγειογένεση και τη μετάσταση (Zhu et al., 2004; Rubie et al., 2007; Palena et al., 2012).

Επιπλέον, η IL-8 λειτουργεί ως χημειοτακτικός παράγοντας για κάποιες κατηγορίες λευκοκυττάρων όπως τα ουδετερόφιλα και τα φυσικά φονικά κύτταρα (Brew et al., 2000; Rubie et al., 2007). Συγκεκριμένα σε περιπτώσεις καρκίνου του παχέος εντέρου έχει αναφερθεί ότι δρα ως αυτοκρινής/παρακρινής παράγοντας ανάπτυξης συμβάλλοντας στην εξέλιξη του όγκου ενώ μπορεί να επάγει και τη μετάσταση επηρεάζοντας συνολικά την επιβίωση (Haraguchi et al., 2002; Terada et al., 2005; Rubie et al., 2007; Bondurant et al., 2013). Αναφορικά με τον καρκίνο του προστάτη έχει φανεί ότι η IL-8 συσχετίζεται με αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μετάσταση ενώ επάγει την κυτταρική προσκόλληση τόσο στο ενδοθήλιο όσο και στην εξωτερική μήτρα, με αποτέλεσμα να αποτελεί μόριο-κλειδί και σε αυτήν την περίπτωση (Murphy et al., 2005; Engl et al., 2006). Συνεπώς, ουσίες που μπορούν να συμβάλλουν στη μείωση των επιπέδων της μπορεί να έχουν ευεργετική δράση στην αντιμετώπιση καταστάσεων καρκίνου.

Στο διάγραμμα 3.5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης του αφεψήματος από Μελισσόχορτο στα επίπεδα της IL-8 που εκκρίνονται από τα διεγερμένα με TNF-α PC3 και HT-29 κύτταρα συγκριτικά με τα επίπεδα της IL-8 που εκκρίνονται από κύτταρα που έχουν διεγερθεί, επίσης, με TNF-α αλλά δεν έχει γίνει επίδραση με το αφέψημα (θετικό control). Τα επίπεδα της IL-8 μετρήθηκαν και σε μη διεγερμένα κύτταρα (αρνητικό

control). Η διέγερση με TNF- α πραγματοποιήθηκε ώστε να γίνει προσομοίωση ενός μοντέλου φλεγμονής, όπως παρατηρείται στις διάφορες μορφές καρκίνου. Έπειτα από σύγκριση των επιπέδων έκκρισης της IL-8 ανάμεσα σε διεγερμένα και μη διεγερμένα κύτταρα, βρέθηκε ότι ο TNF- α , όπως ήταν αναμενόμενο, λειτουργεί ως παράγοντας φλεγμονής αυξάνοντας τα επίπεδα της IL-8. Σε αυτό το σημείο, αξίζει να σημειωθεί ότι μελετήθηκε μόνο η επίδραση της μικρότερης συγκέντρωσης (0.2 μ g/ μ L) στα επίπεδα της IL-8 καθώς σκοπός του πειράματος ήταν να αναδειχθεί ότι η μείωση της ήταν αποτέλεσμα μειωμένης έκκρισής από τα κύτταρα και όχι μειωμένου αριθμού κυττάρων.



Διάγραμμα 3.5: % μεταβολή των επιπέδων της IL-8 μετά από επίδραση με το αφέψημα σε διεγερμένα με TNF- α PC3 και HT-29 καρκινικά κύτταρα συγκριτικά με το θετικό control. Ο (*) υποδηλώνει την ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς ($p < 0.05$).

Όπως γίνεται φανερό από το παραπάνω διάγραμμα, η επώαση των κυτταρικών σειρών PC3 και HT-29 με το αφέψημα οδήγησε σε μείωση των επιπέδων της ιντερλευκίνης-8, και, επομένως, το αφέψημα είναι σε θέση να εκδηλώνει αντιφλεγμονώδη δράση. Η μείωση παρατηρήθηκε μόνο έπειτα από τις 48 ώρες επώασης και ήταν σημαντικά μεγαλύτερη για τα HT-29 καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου συγκριτικά με την αντίστοιχη για τα κύτταρα του προστάτη. Ωστόσο, η παρατηρούμενη μείωση ήταν στατιστικά σημαντικά μόνο για τα HT-29 κύτταρα ($p < 0.01$) και η % μεταβολή των επιπέδων της IL-8 ήταν 80%.

Η μείωση που παρατηρείται στα επίπεδα της ιντερλευκίνης-8 μπορεί να αποδοθεί εν μέρει στην επαγόμενη από το αφέψημα αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, όπως αυτή σημειώθηκε στην παράγραφο 3.1 ακόμα και για τη μικρότερη συγκέντρωση, που οδηγεί σε μειωμένο αριθμό κυττάρων άρα και σε μειωμένα επίπεδα έκκρισης της. Σημειώνεται επίσης ότι οι συνολικές πρωτεΐνες μετά τη δράση του αφεψήματος και στις

δύο κυτταρικές σειρές δεν παρατηρούνται μειωμένες, σε βαθμό που να δικαιολογεί μείωση των επιπέδων της IL-8 στα HT29 κατά 80%. Θα πρέπει να ληφθεί, ακόμη, υπόψη ότι η επίδραση των διαφόρων αφεψημάτων ή επιμέρους βιοδραστικών συστατικών τους, παρουσιάζει σε ορισμένες περιπτώσεις ειδικότητα ως προς τον τύπο των κυττάρων (Ramos, 2007), γεγονός που θα μπορούσε να ερμηνεύσει σε κάποιο βαθμό τη μεγαλύτερη μείωση της IL-8 στα κύτταρα HT-29. Ένας από τους βασικούς μηχανισμούς επαγωγής της έκφρασης της IL-8 αποτελεί η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ, ο οποίος αποτελεί το σημαντικότερο μόριο που μεσολαβεί τη σχέση φλεγμονής-καρκινογένεσης και εκφράζεται σε όλους σχεδόν τους τύπους καρκίνου (Surh et al., 2005).

Βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με την επίδραση του συγκεκριμένου αφεψήματος στα επίπεδα της IL-8 δεν υπάρχουν ενώ εκείνες που αφορούν στα επιμέρους συστατικά του και την επίδρασή τους στη συγκεκριμένη ιντερλευκίνη είναι πολύ περιορισμένες. Στους διατροφικούς παράγοντες που επιδρούν στα επίπεδα της IL-8 που εκκρίνονται από τα καρκινικά κύτταρα συγκαταλέγονται η ρεσβερατρόλη, η κουρκουμίνη, η γενιστεΐνη και η EGCG. Τα συστατικά αυτά μπορούν να αναστέλλουν την παραγωγή της IL-8 τόσο σε επίπεδο πρωτεΐνης όσο και σε επίπεδο mRNA, να παρεμποδίζουν το σηματοδοτικό μονοπάτι που μεσολαβείται από την ίδια και τον αντίστοιχο υποδοχέα της και να μειώνουν την έκφραση της μέσω της αναστολής του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές και οι επιδράσεις αυτές ενδέχεται να είναι δοσοεξαρτώμενες (Patel et al., 2002; Shen et al., 2003; Porath et al., 2005). Επιπλέον, το πρωτοκατεχικό οξύ μετά από επίδραση σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του προστάτη, του μαστού, των πνευμόνων, του ήπατος και του τραχήλου της μήτρας ήταν σε θέση να μειώνει τα επίπεδα της IL-8 (Yin et al., 2009).

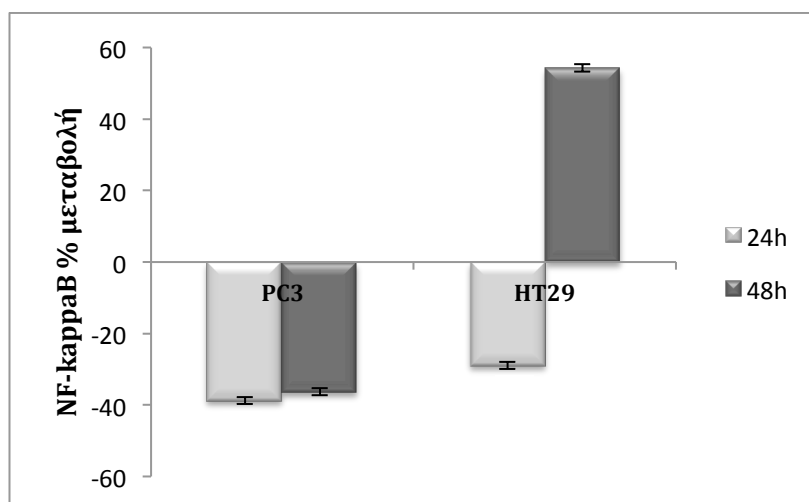
3.3.5 Μελέτη της επίδρασης του αφεψήματος στα επίπεδα του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα-κΒ (NF-κΒ) p65 στις κυτταρικές σειρές HT-29 και PC-3

Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ εντοπίζεται σε όλους τους τύπους κυττάρων, βρίσκεται, όμως, στην ανενεργή του μορφή (Haddad & Abdel-Karim, 2011). Η ρύθμιση της δραστηριότητας του NF-κΒ υπόκειται στη ρύθμιση της ικανότητας του να προσδένεται στο DNA (Vendramini-Costa & Carvalho, 2012). Το μονοπάτι ενεργοποίησης του NF-κΒ διεγείρεται από προφλεγμονώδη μόρια (TNF-α, IL-1), γονιδιο-τοξικό στρες, ιστικές βλάβες, ογκογονίδια, ιούς, αυξητικούς παράγοντες, καθώς και από συνθήκες υποξίας ή οξύτητας

στην περίπτωση συμπαγών όγκων (Aggarwal et al., 2009a). Οι διμερείς υπομονάδες p65 και p50 αποτελούν τον ενεργό μεταγραφικό παράγοντα, ο οποίος μετά την απέλευθερωσή του από το κυτταρόπλασμα μετατοπίζεται στον πυρήνα (Darnell, 2002). Η ενεργοποίηση του NF-κΒ επιδρά αρνητικά στη διαδικασία της απόπτωσης αναστέλλοντας τη μέσω της επαγωγής γονιδίων επιβίωσης και αναστολής γεγονότων που σχετίζονται με τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην ενίσχυση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την ανάπτυξη των όγκων (Perkins & Gilmore, 2006; Escárcega et al., 2007; Ramos, 2008).

Στις περιπτώσεις καρκίνου του προστάτη αλλά και του παχέος εντέρου, ο NF-κΒ είναι ενεργοποιημένος και εκφράζεται διαρκώς (Aggarwal & Gehlot, 2009). Έχει αναφερθεί ότι η ενεργοποίηση του στον καρκίνο του προστάτη αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για υποτροπή των βιοχημικών δεικτών ενώ συσχετίζεται με τη μετάσταση στους λεμφαδένες αλλά και την κακή έκβαση των ασθενών (Ismail et al., 2004; Dormingo-Domenech et al., 2005; Lessard et al., 2005). Όσον αφορά τον καρκίνο του παχέος εντέρου, τα αυξημένα επίπεδα του NF-κΒ έχουν συσχετισθεί με επιδείνωση της κλινικής έκβασης ασθενών που έχουν υποβληθεί σε ακτινοθεραπεία (Voboril et al., 2008). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, γίνεται αντιληπτό ότι παράγοντες που μπορούν να αναστέλλουν την ενεργοποίηση του NF-κΒ, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως χημειοπροστατευτικοί και να συμβάλλουν σημαντικά στην αντιμετώπιση και τη θεραπεία του καρκίνου.

Στο διάγραμμα 3.6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης του αφεψήματος από Μελισσόχορτο στα επίπεδα του NF-κΒ στα PC3 και HT-29 καρκινικά κύτταρα μετά από 24 και 48 ώρες, τα οποία είχαν διεγερθεί προηγουμένως με τον παράγοντα TNF-α. Η διέγερση των κυττάρων με TNF-α προηγήθηκε καθώς είναι γνωστό ότι όλα σχεδόν τα κύτταρα όταν εκτίθενται σε αυτόν τον παράγοντα, εμφανίζουν ενεργοποίηση του NF-κΒ (Aggarwal & Shishodia, 2006; Herrera-Carrera et al., 2015).



Διάγραμμα 3.6: % μεταβολή των επιπέδων του NF-κΒ μετά από επίδραση με το αφέψημα σε διεγερμένα με TNF-α PC3 και HT-29 καρκινικά κύτταρα συγκριτικά με το θετικό control. Ο (*) υποδηλώνει την ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς ($p < 0.05$).

Όπως γίνεται φανερό από το διάγραμμα, η επίδραση του αφεψήματος στα διεγερμένα PC3 κύτταρα του προστάτη οδηγεί σε αναστολή της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ τόσο μετά τις 24 όσο και μετά τις 48 ώρες επώασης συγκριτικά με τα διεγερμένα κύτταρα στα οποία δεν έχει γίνει επίδραση με το αφέψημα (θετικό control). Μάλιστα, παρατηρείται σχετικά μεγαλύτερη αναστολή μετά τις 24 ώρες επώασης-περίπου 40%-συγκριτικά με τις 48 ώρες, όπου το ποσοστό αναστολής είναι 35%. Όσον αφορά τα HT-29 κύτταρα του παχέος εντέρου, ενώ μετά από 24 ώρες επώαση με το αφέψημα τα επίπεδα του παράγοντα NF-κΒ μειώνονται σε ποσοστό 30%, μετά από τις 48 ώρες σημειώνεται σημαντική αύξηση, δηλαδή ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα, σε ποσοστό περίπου 60%. Η % παρατηρούμενη μεταβολή των επιπέδων του NF-κΒ ήταν στατιστικά σημαντική και για τις δυο καρκινικές κυτταρικές σειρές και μετά από 24 και μετά από 48 ώρες επώασης ($p < 0.05$).

Συγκεκριμένα για τα φλαβονοειδή, μελέτες αναφέρουν την ικανότητά τους να μειώνουν την έκφραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως είναι ο TNF-α (*Cho et al., 2003; Serafini et al., 2010*). Στους μηχανισμούς μέσω των οποίων εκδηλώνεται αυτή η τροποποιητική δράση συγκαταλέγεται και η ικανότητα αναστολής μεταγραφικών παραγόντων όπως ο NF-κΒ και η AP-1 καθώς και η μείωση της δραστηριότητας των MAP κινασών (MAPK) (*Bode & Dong, 2004*). Στις ουσίες που εκδηλώνουν ανασταλτική επίδραση στην έκφραση και ενεργοποίηση του NF-κΒ συμπεριλαμβάνονται η απιγενίνη, η καμπφερόλη και η λουτεολίνη (*Santangelo et al., 2007; Ju et al., 2007; Lopez-Lazaro, 2009*). Επιπλέον, υπάρχουν δεδομένα για την ευεργετική επίδραση που εκδηλώνουν το

ουρσολικό οξύ και ο φαιν-αιθυλ-εστέρας του καφεϊκού οξέος (CAPE) σχετικά με την αναστολή του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ, δράση που εκδηλώνεται μέσω της αναστολής της δράσης της IκΒα κινάσης ή της φωσφορυλίωσης της υπομονάδας p65 (Shishodia *et al.*, 2003; Ichikawa *et al.*, 2007; Kaefer & Milner, 2008; Aggarwal *et al.*, 2009b).

Σχετικά με την ενεργοποίηση του NF-κΒ που σημειώθηκε για τα HT-29 κύτταρα του παχέος εντέρου έπειτα από την επώαση με το αφέψημα για 48 ώρες, μια πρόσφατη μελέτη για την ίδια κυτταρική σειρά αναφέρει ότι η αύξηση στα επίπεδα ενεργοποίησης του συγκεκριμένου μεταγραφικού παράγοντα παρατηρείται ως απόκριση του κύτταρου σε περιπτώσεις καταστροφής του DNA. Συγκεκριμένα, η αύξηση παρατηρείται τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης και ενδέχεται να λειτουργεί ως μηχανισμός που επιτρέπει την επιδιόρθωση του DNA (McCool & Miyamoto, 2012; Saldanha *et al.*, 2014). Ωστόσο, επεξηγείται ότι η επίδραση του εκάστοτε βιοδραστικού παράγοντα και σε άλλα μόρια και μηχανισμούς (για παράδειγμα, στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου) μπορεί τελικά να παρεμποδίζει την επιδιόρθωση του DNA των καρκινικών κυττάρων (Saldanha *et al.*, 2014). Παρόμοια, σε μια άλλη μελέτη αναφέρεται ότι η επώαση HepG2 κυττάρων με επικατεχίνη οδήγησε στην ενεργοποίηση του NF-κΒ (από τη στιγμή έγινε η επίδραση με επικατεχίνη μέχρι και τα επόμενα 240 λεπτά) μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού ERK συμβάλλοντας στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Granado-Serano *et al.*, 2010).

Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο τόσο για τα επίπεδα της IL-8 όσο και για τα επίπεδα της ενδοκυττάριας GSH. Συνεπώς, η παρατηρούμενη μείωση στα επίπεδα του και στις δυο κυτταρικές σειρές μετά από την επώαση με το αφέψημα για 24 ώρες θα μπορούσε να ερμηνεύσει τη μείωση τόσο στα επίπεδα της ιντερλευκίνης-8 όσο και στα επίπεδα της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης. Για τα PC3 κύτταρα η σχέση αυτή θα μπορούσε να ερμηνεύσει τη μειωμένη έκκριση της IL-8 και στις 48 ώρες επώασης καθώς η ενεργοποίηση του NF-κΒ σημειώνει, επίσης, μείωση. Ωστόσο, για τα HT-29 κύτταρα πιθανά υπάρχει κάποιος άλλος μηχανισμός που επεξηγεί τη μείωση της IL-8 δεδομένου ότι ο παράγοντας NF-κΒ φαίνεται να ενεργοποιείται σε σημαντικό ποσοστό έπειτα από 48 ώρες επώασης με το αφέψημα για τη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά, υποδηλώνοντας ότι η αναστολή της ενεργοποίησής του επηρεάζεται από τον κυτταρικό τύπο.

Επίλογος-Συμπεράσματα

Σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα, η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου σημειώνει σημαντική αύξηση κατά τα τελευταία χρόνια ενώ αποτελεί και τη δεύτερη αιτία θανάτου παγκοσμίως. Τις τελευταίες δεκαετίες το επιστημονικό ενδιαφέρον έχει στραφεί στην αναζήτηση φυσικών προϊόντων ως μια άμεσα εφαρμόσιμη, αποδεκτή και προσιτή προσέγγιση για την πρόληψη και τη διαχείριση του καρκίνου/αυτής της νόσου. Σε αυτά συγκαταλέγονται τα φρούτα, τα λαχανικά, τα δημητριακά ολικής άλεσης και τα αφεψήματα βοτάνων αλλά και μικροσυστατικά όπως οι βιταμίνες, τα μέταλλα, τα ιχνοστοιχεία και ενώσεις που δεν έχουν θρεπτική αξία, όπως οι πολυφαινόλες. Στη βιβλιογραφία συναντώνται πολλές μελέτες που υποστηρίζουν ότι η υιοθέτηση ενός υγιεινού τρόπου διατροφής μπορεί να συμβάλει σημαντικά στη μείωση εμφάνισης χρόνιων νοσημάτων, συμπεριλαμβανομένων και διαφόρων μορφών καρκίνου και, ειδικότερα, εκείνων που σχετίζονται με τη διατροφή όπως είναι ο καρκίνος του παχέος εντέρου, του προστάτη και του μαστού.

Τα πλεονεκτήματα των διαιτητικών βιοδραστικών συστατικών ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες συγκριτικά με τα φάρμακα, αφορούν στο γεγονός ότι αποτελούν ευρέως διαδεδομένα συστατικά, ότι μπορούν να απομονωθούν με μικρό κόστος και ότι θεωρούνται ουσίες που χαρακτηρίζονται από ελάχιστη ή μικρότερη τοξικότητα. Επιπλέον, πρόκειται για παράγοντες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πολλαπλά στάδια παρέμβασης επιδρώντας ταυτόχρονα σε περισσότερους από έναν μηχανισμούς και που έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν προληπτικά όταν ακόμη οι προνεοπλασματικές αλλοιώσεις είναι μη ανιχνεύσιμες. Συγκεκριμένα τα ροφήματα, αποτελούν έναν τρόπο παρασκευής των βοτάνων διαδεδομένο ήδη από την αρχαιότητα για τις ωφέλιμες επιδράσεις του στην υγεία και τη δυνατότητα κατανάλωσης τους με μεγάλη συχνότητα χωρίς ανεπιθύμητες παρενέργειες. Στις μέρες μας είναι πλέον γνωστό ότι αυτές οι ωφέλιμες επιδράσεις οφείλονται στην παρουσία βιοδραστικών συστατικών που είναι γνωστά ως φυτοχημικά.

Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι το αφέψημα Μελισσόχορτου περιέχει πολυφαινολικά συστατικά καθώς και παράγωγά τους, ενώ ένα μέρος αυτών ανήκει στις φλαβονόλες. Από τα φαινολικά συστατικά που απαρτίζουν τη σύνθεση του αφεψήματος, εκείνο που ανιχνεύθηκε σε μεγαλύτερη ποσότητα ήταν το ροσμαρινικό οξύ ενώ σημαντικές ποσότητες σημειώθηκαν και για τις τερπενοειδείς φαινόλες θυμόλη και καρβακρόλη. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων για τα πτητικά συστατικά που

περιέχονται στο αφέψημα προέκυψε ότι το κυρίαρχο συστατικό ήταν το μονοτερπένιο καρβακρόλη.

Αναφορικά με την αντιοξειδωτική ικανότητα του αφεψήματος, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αποδεικνύουν ότι εμφανίζει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση μέσω της δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH[•], της εμφάνισης αναγωγικής ισχύος στα κατιόντα σιδήρου αλλά και μέσω του σχηματισμού χηλικών συμπλόκων με κατιόντα σιδήρου και χαλκού.

Η μελέτη για την εκδήλωση χημειοπροστατευτικής δράσης του αφεψήματος στις καρκινικές κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου (HT29) και του προστάτη (PC3) οδήγησε στα ακόλουθα συμπεράσματα:

(α) το αφέψημα είναι σε θέση να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων *in vitro* με δοσο- και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο πιθανά μέσω της επίδρασης που παρατηρήθηκε στον κυτταρικό κύκλο και, συγκεκριμένα, μέσω της αναστολής του στη φάση S

(β) μπορεί να επάγει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο ενώ σημειώνεται και σχέση χρονο-εξάρτησης για τη μεγαλύτερη συγκέντρωση που μελετήθηκε

(γ) ένας πιθανός μηχανισμός για την ενεργοποίηση της αποπτωτικής διαδικασίας ενδέχεται να είναι η επίδραση του αφεψήματος στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων που προσδιορίστηκε μέσω της μείωσης των επιπέδων της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης (GSH) έπειτα από επώαση με το αφέψημα για 24 ώρες

(δ) το αφέψημα εκδηλώνει αντιφλεγμονώδη δράση, όπως προκύπτει από την επαγόμενη μείωση των επιπέδων της προφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-8 μετά από επώαση για 48 ώρες κυρίως στα HT-29 κύτταρα

(ε) ένας πιθανός μηχανισμός της μείωσης των επιπέδων της IL-8 κυρίως στα PC3 κύτταρα ενδέχεται να είναι η αναστολή της ενεργοποίησης του NF-κΒ. Αντίθετα, ο μηχανισμός αυτός δε φαίνεται να αιτιολογεί τα εκκρινόμενα επίπεδα της IL-8 στα HT-29 κύτταρα.

(στ) η μειωμένη ενεργοποίηση του NF-κΒ, η οποία επηρεάζεται από τον κυτταρικό τύπο, θα μπορούσε να συσχετισθεί με τα μειωμένα επίπεδα της ενδοκυττάριας GSH, κυρίως για τα PC3 κύτταρα.

Παρά το γεγονός ότι υπάρχει μεγάλο πλήθος ερευνών που υποστηρίζουν τη χημειοπροστατευτική δράση των πολυφαινολικών συστατικών που περιέχονται σε

αφεψήματα βοτάνων, οι υπεύθυνοι μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων αυτή εκδηλώνεται και, ειδικότερα, στις φυσιολογικά προσλαμβανόμενες δόσεις, δεν έχουν διαλευκανθεί πλήρως. Για το λόγο αυτό, κρίνεται αναγκαίο να διεξαχθεί περαιτέρω έρευνα σχετικά με τους μηχανισμούς δράσης σε άλλα κυτταρικά μόρια και μονοπάτια μεταγωγής σήματος, τη βιοδιαθεσιμότητα και τα πιθανά επίπεδα τοξικότητας των συστατικών αυτών καθώς και με την πιθανή συνεργιστική ή ανταγωνιστική δράση που μπορεί να εκδηλώνεται από διαφορετικά φαινορικά συστατικά σε επίπεδο τροφίμου ή και διατροφικού προτύπου ή απο φαινορικά συστατικά και φάρμακα που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση του καρκίνου, τόσο σε κυτταρικές καλλιέργειες όσο και σε ζωικά μοντέλα.

Επιπρόσθετα, η αναγωγή των αποτελεσμάτων από τις εργαστηριακές μελέτες μπορεί να θεωρηθεί αποδεκτή μόνο εφόσον οι ενώσεις αυτές μελετηθούν σε επίπεδο οργανισμού λαμβάνοντας υπόψη τις διάφορες μεταβολικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα. Κάτι τέτοιο μπορεί να επιτευχθεί με τη διεξαγωγή κλινικών δοκιμών, οι οποίες θα διαλευκάνουν τη δράση των συστατικών αυτών στον ανθρώπινο οργανισμό ενώ, παράλληλα, θα συμβάλουν στον προσδιορισμό της βιοδιαθεσιμότητας αλλά και στην επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας και της ασφαλούς κατανάλωσής τους τόσο από τον υγιή πληθυσμό όσο και από ασθενείς που έχουν ήδη διαγνωσθεί με κάποια μορφή καρκίνου. Στη διαδικασία αυτή, ωστόσο, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη και ο ρόλος διαφόρων συγχυτικών παραγόντων που αφορούν τόσο στο γενετικό υπόβαθρο και τον τρόπο ζωής (κατανάλωση αλκοόλ, κάπνισμα, παχυσαρκία) όσο και στην αιτιολογία της νόσου αυτής καθ'εαυτής.

Συμπερασματικά, θα μπορούσε να αναφερθεί ότι η παρούσα μελέτη συνέβαλε στην ενίσχυση των ενδείξεων ότι το αφέψημα Μελισσόχορτου δύναται να εκδηλώσει χημειοπροστατευτική δράση και να αποτελέσει ένα λειτουργικό τρόφιμο που μπορεί να παρέχει πρόσθετα οφέλη για την υγεία, εφόσον τα αποτελέσματά της επιβεβαιωθούν από *in vivo* μελέτες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βιβλιογραφία

- Abascal K**, Ganora L, Yarnell E. The effect of freeze-drying and its implications for botanical medicine: a review. *Phytother Res* 2005; 19: 655-660.
- Abdellatif F**, Boudjella H, Zitouni A, Hassani A. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from leaves of Algerian *Melissa officinalis* L. *EXCLI J* 2014;13:772-781.
- Aboul-Enein HY**, Berczynsk P, Kruk I, Phenolic compounds: the role of redox regulation in neurodegenerative disease and cancer. *Mini Rev Med Chem* 2013; 13: 385–398.
- Ackland ML**, Van de Waarsenburg, Jones R. Synergistic Antiproliferative Action of the Flavonols Quercetin and Kaempferol in Cultured Human Cancer Cell Lines in vivo 2005; 19: 69-76.
- Adam K**, Sivropoulou A, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia* and *Salvia fruticosa*. Essential Oils against Human Pathogenic Fungi. *J Agric Food Chem* 1998; 46:1739-1745.
- Agarwal R**. Cell Signaling and Regulators of Cell Cycle as Molecular Targets for Prostate Cancer by Dietary Agents. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 1051-1059.
- Aggarwal BB**, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 2004; 24: 2783-2840.
- Aggarwal BB**, Gehlot P. Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients? *Cur Opin Pharmacol* 2009; 9: 351-369.
- Aggarwal BB**, Kumar A, Bharti AC. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 2003; 23: 363-398.
- Aggarwal BB**, Shishodia S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharmacol* 2006; 71: 1397-1421.
- Aggarwal BB**, van Kuiken ME, Iyer LH, Harikumar KB, Sung B. Molecular targets of nutraceuticals derived from dietary spices: potential role in suppression of inflammation and tumorigenesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 2009b; 234: 825–849.
- Aggarwal BB**, Vijayalekshmi RV, Sung B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clin Cancer Res* 2009a; 15: 425-30.
- Aggarwal BB**, Vijayalekshmi RV, Sung B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 425-430.

- Aggarwal BB.** Nuclear factor-kappa B: the enemy within. *Cancer Cell* 2004; 6: 203-208.
- Aggarwal BB.** Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 745-756.
- Ahmed FE.** Effect of diet, lifestyle, and other environmental/ chemopreventive factors on colorectal cancer development, and assessment of the risks. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Exotoxicol Rev* 2004; 22: 91-147.
- Akhtar S,** Meeran SM, Katiyar N, Katiyar SK. Grape seed proanthocyanidins inhibit the growth of human non-small cell lung cancer xenografts by targeting insulin-like growth factor binding protein-3, tumor cell proliferation and angiogenic factors. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 821-831.
- Akondzadeh S,** Noroozian M, Mohammadi M, Ohadinia S, Amshidi AH, Khani M. Melissa officinalis extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized placebo controlled trial. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003; 74: 863-866.
- Alarcón E,** Campos AM, Edwards AM, Lissi E, López' Alarcón C. Antioxidant capacity of herbal infusions and tea extracts: a comparison of ORAC- fluorescein and ORAC- pyrogallol red methodologies. *Food Chem* 2008; 107: 114-1119.
- Alasalvar C,** Grigor JM, Zhang D, Quantick PC, Shahidi F. Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins and sensory quality of different colored carrot varieties. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 1410-1416.
- Altenhöfer S,** Kleikers PW, Radermacher KA, Scheurer P, Rob-Hermans JJ, Schiffers P, Ho H, Wingler K, Schmidt HH. The NOX toolbox: validating the role of NADPH oxidases in physiology and disease. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69: 2327-2343.
- Aly AH,** Debbab A, Kjer J, Proksch P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fung Diver* 2010; 41: 1-16.
- Amarowicz R,** Pegg RB, Rahimi-Moghaddam P, Barl B, Weil JA. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry* 2004; 84: 551-562.
- Anand P,** Kunnumakara AB, Sundaram C, et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceut Res* 2008; 25 (9).
- Antolovich M,** Prenzler P, Pastalides E, Donald S. Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst* 2002; 127: 183-198.

- Apostolou A**, Stagos D, Galitsiou E, Spyrou A, Haroutounian S, Portesis N, Trizoglou I, Wallace Hayes A, Tsatsakis AM, Kouretas D. Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of *Vitis vinifera* stem extracts. *Food Chem Toxicol.* (Epub ahead of print) <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.01.029>, 2013.
- Araújo JR**, Goncalves P, Martel F. Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutr Res* 2011; 31: 77-87.
- Arceusz A**, Wesolowski M. Quality consistency evaluation of *Melissa officinalis* L. commercial herbs by HPLC fingerprint and quantitation of selected phenolic acids. *J Pharmaceut Biomed Anal* 2013; 83: 215-220.
- Armogida M**, Nisticò R, Mercuri NB. Therapeutic potential of targeting hydrogen peroxide metabolism in the treatment of brain ischaemia. *Brit J Pharmacol* 2012; 166: 1211–1224.
- Aune D**, Chan DS, Lau R, et al. Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMJ* 2011; 343: d6617.
- Aune D**, Lau R, Chan DS, et al. Dairy products and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Ann Oncol* 2012; 23: 37-45.
- Aune D**, Lau R, Chan DS, et al. Nonlinear reduction in risk for colorectal cancer by fruit and vegetable intake based on meta-analysis of prospective studies. *Gastroenterology* 2011; 141: 106–18.
- Aura AM**. Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. *Phytochem Rev* 2008; 7: 407-429.
- Awad R**, Muhhamad A, Durst T, Trudeau V, Arnason JT. Bioassay- guided fractionation of lemon balm (*Melissa officinalis*) using an in vitro measure of GABA transaminase activity. *Phytother Res* 2009; 23: 1075-1081.
- Azmi AS**, Bhat SH, Hanif S, Hadi SM. Plant polyphenols mobilize endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: a putative mechanism for anticancer properties. *FEBS Lett* 2006; 580: 533–538.
- Azmir J**, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, Jahurul MHA, Ghafoor K, Norulaini NAN, Omar AKM. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J Food Eng* 2013; 117: 426-436.
- Baena R**, Salinas P. Diet and colorectal cancer. *Maturitas* 2015; 80: 258-264.
- Baichwal PA**, Baeuerle VR. Activate Nf-kappa B or die? *Curr Biol* 1997; 7: 94-96.

- Balasundram N**, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence and potential uses. *Food Chem* 2006; 99: 191-203.
- Balkwill F**, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 2005; 7: 211-217.
- Balkwill F**, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow. *Lancet* 2001; 357: 539-545.
- Balkwill F**. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 540-550.
- Balkwill F**. Chemokine biology in cancer. *Sem Immunol* 2003; 15: 49-55.
- Barcellos-Hoff MH**. Integrative radiation carcinogenesis interactions between cell and tissue responses to DNA damage. *Semin Cancer Biol* 2005; 15: 138-148.
- Barros L**, Dueñas M, Dias MI, Sousa MJ, Santos-Buelga C, Ferreira ICFR. Phenolic profiles of cultivated, *in vitro* cultivated and commercial samples of *Melissa officinalis* L infusions. *Food Chem* 2013; 136: 1-8.
- Barros L**, Dueñas M, Dias MI, Soysa MJ, Santos- Buelga C, Ferreira ICFR. Phenolic profiles of *in vivo* and *in vitro* grown *Coriandrum sativum* L. *Food Chem* 2013; 132: 841-848.
- Bartosz G**. Reactive oxygen species: destroyers or messengers? *Biochem Pharmacol* 2009; 77: 1303–1315.
- Bartsch H**, Nair J. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage and repair. *Langenbecks Arch Surg* 2006; 391: 499-510.
- Basar SN**, Zaman R. An Overview of Badranjboya (*Melissa officinalis*) (Mini Review) *Int Res J Biol Sci* 2013; 2: 107-109.
- Basta A**, Tzakou O, Couladis M. Composition of the leaves essential oil of *Melissa officinalis* from Greece. *Flavour Fragr. J* 2005; 20: 642-644.
- Bavaresco L**. Role of viticultural factors on stilbene concentrations of grapes and wine. *Drugs under Experimental and Clinical Research* 2003; 29: 181-187.
- Beckman KB**, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998; 78: 547–581.
- Bedard K**, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007; 87: 245-313.
- Beecher GR**. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrences and intake. *Am Soc Nutr Sci* 2003; 3248-3254.

- Begley LA**, Kasina S, Mehra R, Adsule S, Admon AJ, Lonigro RJ Chinnaiyan AM, Macoska JA. CXCL5 promotes prostate cancer progression. *Neoplasia* 2008; 10: 244-254.
- Bergonzi MC**, Bilia AR, Gallori S, Guerrini D, Vincieri FF. Variability in the content of the constituents of *Hypericum perforatum* L. and some commercial extracts. *Drug Dev Ind Pharm* 2001; 27: 491-497.
- Bharti AC**, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 883-888.
- Bhat SK**, East JE. Colorectal cancer: prevention and early diagnosis. *Medicine* 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpmed.2015.03.009>
- Bidoli E**, Talamini R, Bosetti C, Negri E, Maruzzi D, et al. Macronutrients, fatty acids, cholesterol, and prostate cancer risk. *Ann Oncol* 2005; 16: 152-157.
- Blagosklonny MV**, Pardee AB. Review: The restriction point of the cell cycle. *Cell Cycle* 2002; 1: 103-110.
- Blasa M**, Gennari L, Angelino D, Ningali P. Fruit and vegetable antioxidants in health. In: Watson R, Preedy V (Eds). *Bioactive Foods in promoting health- Fruits and Vegetables*. Academic Press, Massachusetts 2010; 37-58.
- Block KI**, Gyllenhaal C. Clinical Corner: Herb-Drug Interactions in Cancer Chemotherapy: Theoretical Concerns Regarding Drug Metabolizing Enzymes. *Integr Cancer Ther* 2002; 1: 83-89.
- Bode AM**, Dong Z. Targeting signal transduction pathways by chemopreventive agents. *Mutat Res* 2004; 555: 33-51.
- Boland CR**. Malignant tumors of the colon. In: Yamada T, Alpers DH, Kaplowitz N, Laine L, Owyang C, Powell DW (Eds). *Textbook of Gastroenterology*, Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2003; 1940-1989.
- Bolkent S**, Yanardag R, Karabulut- Bulan O, Yesilyaprak B. Protective role of *Melissa officinalis* L. extract on the liver of hyperlipidemic rats: a morphological and biochemistry study. *J Ethno-Pharmacol* 2005; 99: 391-398.
- Bondurant KL**, Lundgreen A, Herrick JS, Kadlubar S, Wolff RK, Slattery ML. Interleukin genes and associations with colon and rectal cancer risk and overall survival. *Int J Cancer* 2013; 132: 905-915.
- Borel F**, Lacroix B, Margolis RL. Prolonged arrest of mammalian cells at the G1/S boundary results in permanent S phase stasis. *J Cell Sci* 2002; 115: 2829-2838.

- Borges F**, Roleira F, Milhazes N, Santana L, Uriarte E. Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity. *Curr Med Chem* 2005; 12: 887-916.
- Bors W**, Michel C. Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols. *Ann NY Acad Sci* 2002; 957: 57-69.
- Bostwick DG**, Liu L, Brawer MK, Qian J. High- grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Rev Urol* 2004; 6: 171-179.
- Bours V**, Bentires-Alj M, HellinAC, Viatour P, Robe P, Delhalle S, et al. Nuclear factor-kappa B, cancer and apoptosis. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 1085-1089.
- Bradamante S**, Barenghi L, Villa A. Cardiovascular protective effects of resveratrol. *Cardiovasc Drug Rev* 2004; 22: 169-188.
- Bravo L**. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr Rev* 1998; 56: 317-333.
- Brenner H**, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet* 2014; 383: 1490-1502.
- Brew R**, Erikson JS, West DC, Kinsella AR, Slavin J, Christmas SE. Interleukin-8 as an autocrine growth factor for human colon carcinoma cells in vitro. *Cytokine* 2000; 12: 78-85.
- Brigati C**, Noonan DM, Albibi A, Benelli R. Tumors and inflammatory infiltrates: Friends or foes? *Cin Exp Met* 2002; 19: 247-258.
- Bush AI**. The metallobiology of Alzheimer's disease. *Tren Neurosc* 2003; 26: 207-214.
- Cai YZ**, Luo Q, Sun M, Corke H. Antioxidant and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci* 2004; 74: 2157-2184.
- Cai YZ**, Sun M, Xing J, Luo Q, Corke H. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sci* 2006; 78: 2872-2888.
- Canadanovic-Brunet J**, Cetkovic G, Djilas S, Tumbas V, Bogdanovic G, Mandic A, Markov S, Cvetkovic D, Canadanovic V, Radical scavenging, antibacterial, and antiproliferative activities of *Melissa officinalis* L. extracts. *J Med Food* 2008; 11: 133-143.
- Canavese M**, Santoa L, Raje N. Review: Cyclin dependent kinases in cancer: Potential for therapeutic intervention *Cancer Biol Ther* 2012; 13: 451-457.
- Capecka E**, Mareczek A, Leja M, Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species, *Food Chem* 2005; 93: 223-226.

- Carethers JM**, Boland CR. Neoplasia of the gastrointestinal tract. In: Yamada T, Alpers DH, Kaplowitz N, Laine L, Owyang C, Powell DW (Eds). Textbook of Gastroenterology, Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2003; 557-583.
- Caridi D**, Trenerry VC, Rochfort S, Duong S, Laughter D, Jones R. Profiling and quantifying quercetin glycosides in onion (*Allium cepa* L.) varieties using capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography. Food Chem 2007; 105: 691-699.
- Carnat AP**, Carnat A, Fraise D, Lamaison JL. The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *Officinalis*) tea. Pharmaceut Acta Hel 1998; 72: 301-305.
- Cazanave S**, Berson A, Haouzi D, Vadrot N, Fau D, Grodet A, Letteron P, Feldmann G, El-Benna J, Fromenty B, Robin MA, Pessayre D. High hepatic glutathione stores alleviate fas-induced apoptosis in mice. J Hepatol 2007; 46: 858-868.
- Center MM**, Jemal A, Smith RA, Ward E. Worldwide variations in colorectal cancer. CA Cancer J Clin 2009; 59: 366-378.
- Chan DS**, Lau R, Aune D, et al. Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. PLoS One 2011; 6: e20456.
- Chanda S**, Dave R. In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: an overview. Afr J Microbiol Res 2009; 3: 398-996.
- Chang HP**, Sheen LY, Lei YP. The protective role of carotenoids and polyphenols in patients with head and neck cancer. J Chin Med Assoc 2015; 78: 89-95.
- Chang L**, Karin M. Mammalian MAP kinase signaling cascades. Nature 2001; 410: 37-40.
- Chaouki W**, Leger DY, Liagre B, Beneytout JL, Hmamouchi M. Citral inhibits cell proliferation and induces apoptosis and cell cycle arrest in MCF-7 cells. Fund Clin Pharmacol 2009; 23: 549-556.
- Chen C**, Kong AN. Dietary cancer-chemopreventive compounds: from signaling and gene expression to pharmacological effects. Trends Pharmacol Sci 2005; 26: 318-326.
- Chen YJ**, Shiao MS, Wang SY. The antioxidant caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis associated with selective scavenging of hydrogen peroxide in human leukemic HL-60 cells. Anti-cancer Drugs 2001; 12: 143-149.
- Cheng AC**, Huang TC, Lai CS, Pan MH. Induction of apoptosis by luteolin through cleavage of Bcl-2 family in human leukemia HL-60 cells. Eur J Pharmacol 2005; 509: 1-10.

Cheyrier V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 223-229.

Cho SY, Park SJ, Kwon MJ, Jeong TS, Bok SH, Choi WY, Jeong WI, Ryu SY, Do SH and 3 more. Quercetin suppresses proinflammatory cytokines production through MAP kinases and NF-kappa B pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophage. *Mol Cell Biochem* 2003; 243: 153-160.

Choudhuri T, Pal S, Das T, Sa G. Curcumin selectively induces apoptosis in deregulated cyclin D1-expressed cells at G2 phase of cell cycle in a p53 dependent manner. *J Biol Chem* 2005; 280: 20059-20068.

Chung MJ, Cho SY, Bhuiyan MJH, Kim KH, Lee SJ. Anti-diabetic effects of lemon balm (*Melissa officinalis*) essential oil on glucose- and lipid-regulating enzymes in type 2 diabetic mice. *Brit J Nutr* 2010; 104: 180-188.

Cimino S, Sortino G, Favilla V, Castelli T, Madonia M, Sansalone S, Russo GI, Morgia G. Polyphenols: Key Issues Involved in Chemoprevention of Prostate Cancer. *Oxid Med Cel Long* 2012; 8 pages.

Colli JL, Colli A. International comparisons of prostate cancer mortality rates with dietary practices and sunlight levels. *Urol Oncol* 2006; 24: 184-194.

conditions. *IUBMB Life* 2007; 59: 308-315.

Cosge B, Ipek A, Gurbuz B. GC/MS analysis of herbage essential oil from Lemon balms (*Melissa officinalis* L.) grown in Turkey. *J Appl Biol Sci* 2009; 3: 149-152.

Cotelle N. Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem* 2001; 1: 569-590.

Coussens L, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420: 860-867.

Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharm* 2005; 100: 72-79.

Crowe FL, Key TJ, Appleby PN, Travis RC, Overvad K, et al. Dietary fat intake and risk of prostate cancer in European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am J Clin Nutr* 2008; 87: 1405-113.

Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15: 49-63.

D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita* 2007; 43: 348-361.

Dagnelie PC, Schuurman AG, Goldbohm RA, Van Den Brandt PA. Diet, anthropometric measures and prostate cancer risk: a review of prospective cohort and intervention studies. *BJU Int* 2004; 93: 1139-1150.

Dai J, Mumper RJ. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* 2010; 15: 7313-7352.

Dairam A, Fogel R, Daya S, et al. Antioxidant and iron-binding properties of curcumin, capsaicin, and S-allylcysteine reduce oxidative stress in rat brain homogenate. *J Agric Food Chem* 2008; 56: 3350–3356.

Darnell JE Jr. Transcription factors as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 740-9.

Dastmalchi K, Dorman D, Oinonen P, Darwis Y, Laakso I, Hitlunen R. Chemical composition and *in vitro* antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. *LWT- Food Sci Technol* 2008; 41: 391-400.

de Kok TM, van Breda SG, Manson MM. Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds: A review. *Eur J Nutr* 2008; 47 (Suppl 2): 51-59.

de la Lastra CA, Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans* 2007; 35: 1156-1160.

de Pascual-Teresa S, Moreno DA, García- Viguera C. Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: A Review of current evidence. *Int J Mol Sci* 2010; 11: 1679-1703.

de Souza AC, Alviano DS, Blank AF, Alves PB, Alviano CS, Gattass CR. *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *J Pharm Pharmacol* 2004; 56: 677-681.

de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 24-37.

Delmas D, Lancon A, Colin D, Jannin B, Latruffe N. Resveratrol as a chemopreventive agent: A promising molecule for fighting cancer. *Curr Drug Targets* 2006; 7: 423-442.

Delmas D, Solary E, Latruffe N. Resveratrol, a phytochemical inducer of multiple cell death pathways: apoptosis, autophagy and mitotic catastrophe. *Curr Med Chem* 2011; 18: 1100-1121.

Dhawan P, Richmond A. Role of CXCL1 in tumorigenesis of melanoma. *J Leukoc Biol* 2002; 72: 9-18.

Dihal AA, Woutersen RA, van Omnen B, Rietjens IMCM, Stierum RB. Modulatory effects of quercetin on proliferation and differentiation of the human colorectal cell line Caco-2. *Cancer Lett* 2006; 238: 248-259.

- Disilvestro RA.** Flavonoids as Antioxidants. In Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods: Wildman REC, Ed: CRC press: Boca Raton, FL, USA 2001; Chapter 8: 127-142.
- Doll R,** Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. J Natl Cancer Inst 1981; 66: 1191-1308.
- Domingo-Domenech J,** Mellado B, Ferrer B, Truan D, Codony-Servat J, Sauleda S, Alcover J, Campo E, Gascon P, Rovira A et al.: Activation of nuclear factor-kappaB in human prostate carcinogenesis and association to biochemical relapse. Br J Cancer 2005, 93:1285-1294.
- Dorman HJD,** Bachmayer O, Kosar M, Hitlunen R. Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. J Agric Food Chem 2004; 52: 762-770.
- Dranoff G.** Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. Nat Rev Cancer 2004; 4: 11-22.
- Du Y,** Guo H, Lou H. Grape seed polyphenols protect cardiac cells from apoptosis via induction of endogenous antioxidant systems. J Agric Food Chem 2007; 55: 1695-1701.
- Dudareva N,** Negre F, Nagegowda D, Orlova I. Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives. Crit Rev Plant Sci 2006; 25: 417-440.
- Dudareva N,** Pichersky E, Gershenzon J. Biochemistry of plant volatiles. Plant Phys 2004; 135: 1893-1902.
- Durackova Z.** Some current insights into oxidative stress. Physiol Res 2010; 59: 459-469.
- Durko L,** Malecka-Panas E. Lifestyle modifications and colorectal cancer. Curr Colorectal Cancer Rep 2014; 10: 45-54.
- Duthie GG,** Brown KM. Reducing the risk of cardiovascular disease. In Functional Foods: Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals; Goldberg I. Ed: Chapman & Hall: New York, NY, USA. 1994; pp: 19-38.
- Duthie GG,** Duthie SJ, Kyle JA. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. Nutr Res Rev 2000; 13: 79-106.
- Dzierzewicz Z,** Orchel A, Weglarz L, Latocha M, Wilczok T. Changes in the cellular behavior of human colonic cell line CaCo-2 in response to butyrate treatment. Acta Biochem Pol 2002; 49: 211-220.
- Ebrahimnezhad Darzi S,** Amirghofran Z. Dichloromethane fraction of *Melissa officinalis* induces apoptosis by activation of intrinsic and extrinsic pathways in human leukemia cell lines. Immunopharmacol Immunotoxicol 2013; 35: 313-320.

- Elliott R**, Astley S, Southon S, Archer D. Measurement of cellular repair activities for oxidative DNA damage. *Free Rad Biol Med* 2000; 28: 1438-1446.
- Encalada MA**, Hoyos KM, Rehecho S, Berasategi I, de Ciriano MGI, Ansorena D, Astiasarán I, Navarro-Blasco I, Caverio RY, Calvo MI. Anti-proliferative Effect of *Melissa officinalis* on Human Colon Cancer Cell Line. *Plant Food Hum Nutr* 2011; 66: 328-334.
- Engl T**, Relja B, Blumberg C, Müller I, Ringer EM, Beecken WD, Jonas D, Blaheta RA. Prostate tumours CXC-chemokine profile correlates with cell adhesion to endothelium and extracellular matrix. *Life Sci* 2006; 78: 1784-1793.
- Escárcega RO**, Fuentes'Alexandro S, García-Carrasco M, Gatica A, Zamora A. The transcription Factor Nuclear Factor-kappa B and Cancer. Overview. *Clin Oncol* 2007; 19: 154-161.
- Estrela JM**, Ortega A, Obrador E. Glutathione in cáncer biology and therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2006; 43: 143-181.
- Fang J**, Seki T, Maeda H. Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61: 290-302.
- Farzaneh V**, Carvalho I. A review of the health benefit potentials of herbal plant infusions and their mechanism of actions. *Ind Crop Prod* 2015; 65: 247-258.
- Fecka I**, Turek S. Determination of Water-Soluble Polyphenolic Compounds in Commercial Herbal Teas from Lamiaceae: Peppermint, Melissa, and Sage. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 10908-10917.
- Federico A**, Morgillo F, Tuccillo C, Ciardello F, Loguercio C. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *Int J Cancer* 2007; 121: 2381-2386.
- Fedirko V**, Tramacere I, Bagnardi V, et al. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Ann Oncol* 2011; 22:1958-1972.
- Ferlay J**, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008-cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No10. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2010. <http://globocan.iarc.fr> (accessed April 19, 2013).
- Fimognari C**, Nusse M, Cesari R, Iori R, Cantelli-Forti G, Hrelia P. Growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human T-cell leukemia by the isothiocyanate sulforaphane. *Carcinogenesis* 2002; 23:581-586.
- Finley JW**, Kong AN, Hintze KJ, Jeffery EH, Ji LL, Lei XG. Antioxidants in foods: state of the science important to the food chemistry. *J Agric Food Chem* 2011; 59: 6837-6846.

- Fodde R.** The APC gene in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2002; 38: 867-871.
- Fraga CG.** Plant polyphenols: how to translate their in vitro antioxidant actions to in vivo
- Franco R,** Cidlowski JA. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death Dif* 2009; 16: 1303-1314.
- Franco R,** Sanchez-Olea R, Reyes-Reyes EM, Panayiotidis MI. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Menage a trois. *Mutat. Res.* 2009; 674: 3-22.
- Fresco P,** Borges F, Diniz C, Marques MPM. New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Med Res Rev* 2006; 26: 747-766.
- Friedman M,** Henika PR, Levin CE, Mandrell RE. Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in apple juice. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 6042-6048.
- Friesen C,** Kiess Y, Debatin KM. A critical role of glutathione in determining apoptosis sensitivity and resistance in leukemia cells. *Cell Death Differ* 2004; 11 (Suppl. 1): 73-85. 65.
- Gamet-Payraastre L,** Li P, Lumeau S, Cassar G, Dupont M-A, Chevolleau S, Gasc N, Tulliez J, Terce F. Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells. *Cancer Res* 2000; 60: 1426-1433.
- García-Sáez AJ,** Fuertes G, Suckale J, Salgada J. Permeabilization of the Outer Mitochondrial Membrane by Bcl-2 Proteins. *Adv Exp Med Biol* 2010; 677: 91-105.
- Garlanda C,** Riva F, Veliz T, Polentarutti N, Pasqualini F, Radaelli E et al., Increased susceptibility to colitis-associated cancer of mice lacking TIR8, an inhibitory member of the interleukin-1 receptor family. *Cancer Res* 2007; 67: 6017-6021.
- Germano G,** Allavena P, Mantovani A. Mini Review: Cytokines as a key component of cancer-related inflammation. *Cytokine* 2008; 43: 374-379.
- Ghasemzadeh A,** Ghasemzadeh N. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *J Med Plants Res* 2011;
- GLOBOCAN 2012 (IARC). http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx [accessed November 2014].
- Goderska K,** Gumienna M, Czarnecki Z. Release of phenolic compounds from bean flour, bean derived chips and black chokeberry: juice and changes in their antioxidant activity during digestion in an in vitro gastrointestinal model. *Pol J Food Nutr Sci* 2008; 58: 497-501.
- Gonda TA,** Tu S, Wang TC. Chronic inflammation, the tumor microenvironment and carcinogenesis. *Cell Cycle* 2009; 8: 2005-2013.

González-Flecha B, Demple B. Genetic responses to free radicals. Homeostasis and gene control. Ann NY Acad Sci 2000; 899: 69–87.

Gordon MH. Dietary antioxidants in disease prevention. Nat Prod Rep 1996; 265-273.

Gossiau A, Chen KY. Nutraceuticals, apoptosis and disease prevention. Nutr 2004; 20: 95-102.

Grady WM. Genomic instability and colon cancer. Cancer Metast Rev 2004; 23: 11-27.

Grana X, Reddy EP. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin-dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). Oncogene 1995; 11: 211-219.

Granado-Serano AB, Martin MA, Haegeman G, Goya L, Bravo L. Epicatechin induces NF- κ B, activator protein-1 (AP-1) and nuclear transcription factor erythroid 2p45-related factor-2 (Nrf2) via phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) and extracellular regulated kinase (ERK) signalling in HepG2 cells. Br J Nutr 2010; 103: 168-179.

Green DR, Evan GI. A matter of life and death. Cancer Cell 2002; 1: 19-30.

Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation and cancer. Cell 2010; 140: 883-899.

Grivennikov SI, Karin M. Inflammation and oncogenesis: a vicious connection. Curr Opin Genet Dev 2010; 20: 65-71.

Grosso G, Buscemi S, Galvano F, Mistretta A, Marventano S, La Vela V, Drago F, Gangi S, Basile F, Biondi A. Mediterranean diet and cancer: epidemiological evidence and mechanism of selected aspects. BMC Surgery 2013; 13 (Suppl. 2) p: 14.

Gulcin I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). Toxicol 2006; 217: 213-220.

Gupta SC, Kim JH, Prasad S, Aggarwal BB. Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. Cancer Met Rev 2010; 29: 405-430.

Gutierrez J, Barry-Ryan C, Bourke P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. Int J Food Microb 2008; 124: 91-97.

Haddad JJ, Abdel-Karim NE. NF- κ B cellular and molecular regulatory mechanisms and pathways: Therapeutic pattern or pseudoregulation? Cell Immunol 2011; 271:5-14.

Hagerman AE. Tannin Handbook. Department of Chemistry and Biochemistry, Miami University, USA. 2002

Hahn WC, Weinberg RA. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* 2002; 347: 1593–1603.

Half E, Arber N. Colon cancer: preventive agents and the status of chemoprevention. *Expert Opin Pharmacother* 2009; 10: 211-219.

Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J* 2007; 401: 1–11.

Han X, Shen T, Lou H. Dietary Polyphenols and their Biological Significance. *Int J Mol Sci* 2007; 8: 950-988.

Haraguchi M, Komuta K, Akashi A, Matsuzaki S, Furui J, Kanematsu T: Elevated IL-8 levels in the drainage vein of resectable Dukes' C colorectal cancer indicate high risk for developing hepatic metastasis. *Oncol Rep* 2002, 9:159-165.

Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochem* 2000; 55: 481-504.

Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG. Goodman, Gilman's The Pharmacological basis of Therapeutics. 10th Ed McGraw-Hill Professional, 2001.

Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: Controls that ensure the order of the cell cycle events. *Science* 1989; 246: 629-634.

Hata T, Sakaguchi I, Mori M, Ikeda N, Kato Y, Minamini M, Watabe K. Induction of apoptosis by Citrus paradisi essential oil in human leukemic (HL-60) cells. *in Vivo* 2003; 17 553–559.

Heitz A, Carnat A, FraissenD, Carnat AP, Lamaison JL. Luteolin-3-O-glucuronide, the major flavonoid from *Melissa officinalis* subsp. *Officinalis*. *Fitoterapia* 2000; 71: 201-202.

Herrera-Carrera E, Moreno-Jiménez MR, Rocha-Guzmán NE, Gallegos-Infante JA, Diaz-Rivas JO, Gamboa-Gómez CI, Francisco R. Phenolic composition of selected herbal infusions and their anti-inflammatory effect on a colonic model in vitro in HT-29 cells. *Cogent Food & Agriculture* 2015; 1059033

Hinneburg I, Dorman HJD, Hiltunen R. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chem* 2006; 97: 122–129.

Hollman PCH, Katan MB. Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability. *Fod Chem Toxicol* 1999; 37: 937-942.

Hong J, Smith TJ, Ho CT, August DA, Yang CS, Lee SS et al., Inhibition of purified green and black tea polyphenols on cyclooxygenase and lipooxygenase-dependent metabolism of arachidonic acid in human colon mucosa and colon tumor tissues. *Biochem Pharmacol* 2001; 62: 1175-1183.

Horvathova E, Navarova J, Galova E, Sevcovicova A, Chodakova L, Snahnicanova Z, Melusova M, Kozics K, Slamenova D. Assessment of Antioxidative, Chelating, and DNA-Protective Effects of Selected Essential Oil Components (Eugenol, Carvacrol, Thymol, Borneol, Eucalyptol) of Plants and Intact *Rosmarinus officinalis* Oil. J Agric Food Chem 2014; 62: 6632–6639.

Hu R, Kong AN. Activation of MAP kinases, apoptosis and nutrigenomics of gene expression elicited by dietary cancer-prevention compounds. Nutrition 2004; 20: 83-88.

Hu XW, Meng D, Fang J,. Apigenin inhibited migration and invasion oh human ovarian cancer A2780 cells through focal adhesion kinase. Carcinogenesis 2008; 29: 2369-2379.

Huang S, DeGuzman A, Bucana CD, Fidler IJ. Nuclear factorkappaBactivity correlates with growth, angiogenesis, and metastasisof human melanoma cells in nude mice. Clin Cancer Res 2000; 6: 2573–2581.

Huang SC, Ho CT, Lin-Shiau SY, Lin JK. Carnosol inhibits the invasion of B16/F10 mouse melanoma cells by suppressing metalloproteinase-9 through downregulating nuclear factor-kappa B and c-Jun. Biochem Pharmacol 2005; 69: 221-232.

Huang WY, Cai YZ, Zhang Y. Natural Phenolic Compounds From Medicinal Herbs and Dietary Plants: Potential Use For Cancer Chemoprevention. Nutr Cancer 2009; 62: 1-20.

Hussain AI, Anwar F, Iqbal T, Bhatti IA. Antioxidant attributes of four Lamiaceae essential oils. Pak J Bot 2011; 43: 1315-1321.

Hussain AI, Anwar F, Nigam PS, Sarker SD, Moore JE, Rao JR et al. Antibacterial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. LWT- Food Sci Technol 2007; 55: 10908-10917.

Hussain SP, Amstad P, He P, Robles A, Lupold S, Kaneko I, Ichimiya M, Sengupta S, Mechanic L, Okamura S, Hofseth LJ, Moake M, Nagashima M, Forrester KS, Harris CC. p-53-induced upregulation of MnSOD and GPx but not catalase increases oxidative stress and apoptosis. Cancer Res 2004; 64: 2350-2356.

Hussain SP, Harris CC. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. Int J Cancer 2007; 121: 2373-2380.

Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. Nat Rev Cancer 2003; 3: 276-285.

Ichikawa H, Nakamura Y, Kashiwada Y, Aggarwal BB. Anticancer drugs designed by mother nature: ancient drugs but modern targets. Curr Pharm Des 2007; 13:3400–3416.

- Ignat I**, Volf I, Popa VI. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem* 2011; 126: 1821-1835.
- Ismail HA**, Lessard L, Mes-Masson AM, Saad F: Expression of NF-kappaB in prostate cancer lymph node metastases. *Prostate* 2004, 58:308-313.
- Issa AY**, Volate SR, Wargovich MJ. The role of phytochemicals in inhibition of cancer and inflammation: New directions and perspectives. *J Food Comp Anal* 2006; 19: 405-419.
- Jackson H**, Braun CL, Ernst H. The chemistry of novel xanthophyll carotenoids. *Am J Cardiol* 2008; 101: 50-57.
- Jaeschke H**. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: present concepts. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26 (Suppl. 1): 173–179.
- Janina MS**. *Melissa officinalis*. *Int J Aromather* 2003; 10: 132-139.
- Jemal A**, Bray F, Ferlay J. Global Cancer Statistics. *Ca Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90.
- Jess T**, Rungoe C, Peyrin- Biroulet L. Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population- based cohort studies. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012; 10: 639-645.
- Jiang Y**, Ben Q, Shen H, Lu W, Zhang Y, Zhu J. Diabetes mellitus and incidence and mortality of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Eur J Epidemiol* 2011; 26: 863-876.
- John BJ**, Irukulla S, Abulafi AM, Kumar D, Mendall MA. Systematic review adi-pose tissue, obesity and gastrointestinal diseases. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23(11):1511–23.
- Johnson IT**. Anticarcinogenic effects of diet-related apoptosis in the colorectal mucosa. *Food Chem Toxicol* 2002; 40: 1171-1178.
- Johnson IT**. Phytochemicals and cancer. *Proceed Nutr Soc* 2007; 66: 207-215.
- Jomova K**, Barros S, Valko M. Redox active metal- induced oxidative stress in biological systems. *Trans Metal Chem* 2012; 37: 127-134.
- Ju W**, Wang X, Shi H, Chen W, Belinsky SA, Lin Y. A critical role of luteolin-induced reactive oxygen species in blockage of tumor necrosis factor-activated nuclear factor-kappaB pathway and sensitization of apoptosis in lung cancer cells. *Mol. Pharmacol* 2007; 71: 1381–1388.
- Juin P**, Geneste O, Gautier F, Depil S, Campone M. Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nat Rev Cancer* 2013; 13: 455-465.

- Juránek I**, Nikitovic D, Kouretas D, Hayes AW, Tsatsakis AM. Biological importance of reactive oxygen species in relation to difficulties of treating pathologies involving oxidative stress by exogenous antioxidants. *Food Chem Toxicol* 2013; 61: 240-247.
- Kachadourian R**, Day BJ. Flavonoid-induced glutathione depletion: Potential implications for cancer treatment. *Free Rad Biol Med* 2006; 41: 65-76.
- Kaefer CM**, Milner JA. The role of herbs and spices in cancer prevention. *J Nutr Biochem* 2008; 19, 347–361.
- Kai F**, Xiaolei L, Yonggang C, Hanping Q, Lei L, Qianhui Z, Hongli S. Carvacrol inhibits proliferation and induces apoptosis in human colon cancer cells. *Anti-Cancer Drugs* 2015; 26: 813-823.
- Kaliora AC**, Kogiannou DAA, Kefalas P, Papassideri IS, Kalogeropoulos N. Phenolic profiles and antioxidant and anticarcinogenic activities of Greek herbal infusions; balancing delight and chemoprevention? *Food Chem* 2014; 142: 233-241.
- Kamatou GPP**, Viljoen AM, Steenkamp P. Antioxidant, antiinflammatory activities and HPLC analysis of South African *Salvia* species. *Food Chem* 2010; 119: 684-688.
- Kamdem JP**, Adeniran A, Boligon AA, Klimaczewski CV, Elekofehinti OO, Hassan W, Ibrahim M, Waczuk EP, Meinerz DF, Athayde ML. Antioxidant activity, genotoxicity and cytotoxicity evaluation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) ethanolic extract: Its potential role in neuroprotection. *Ind Crop* 2013; 51:26-34.
- Kampa M**, Nifli AP, Notas G, Castanas E. Polyphenols and cancer cell growth. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2007, 159, 79-113.
- Kanadaswami C**, Lee LT, Lee PPH, Hwang JJ, Ke FC, Huang YT, Lee MT. The antitumor activities of flavonoids (Review). *in vivo* 2005; 19: 895-910.
- Kaneuchi M**, Sasaki M, Tanaka Y, Yamamoto R, Sakuragi N, Dahiya R. Resveratrol suppresses growth of Ishikawa cells through down-regulation of EGF. *Int J Oncol* 2003; 23: 1167–1172.
- Karavoltsos S**, Plavsic M, Kalogeropoulos N, Kogiannou DAA, Strmecki S, Sakellari A, Dassenakis M, Scoullou M. Copper complexing properties and physico-chemical characterization of the organic matter in Greek herbal infusions. *Food Chem* 2014; 160: 53-60.
- Kassi E**, Papoutsis Z, Pratsinis H, Aligiannis N, Manousakis M, Moutsatsou P. Ursolic acid, a naturally occurring triterpenoid, demonstrates anticancer activity on human prostate cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007; 133: 493-500.

KehrerJP. Free-radicals as mediators of tissue injury and disease. Crit Rev Toxicol 1993; 23: 21-48.

Kennedy DO, Wake G, Savelev S, Tildesley NTJ, Perry EK, Wesnes KA. Modulation of mood and cognitive performance following acute administration of single doses of *Melissa officinalis* (Lemon Balm) with human CNS nicotinic and muscarinic receptor-binding properties. Neuropsychopharmacology 2003; 28: 1871-1881

Kennedy DO, Wightman EL. Herbal Extracts and Phytochemicals: Plant Secondary Metabolites and the Enhancement of Human Brain Function. Adv Nutr 2011; 2: 32-50.

Khalid KA, Hu W, Cai W. The Effects of Harvesting and Different Drying Methods on the Essential Oil Composition of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.). J Es Oils Bear Plants 2013; 342-349.

Khan N, Syed DN, Ahmad N, Mukhtar H, Fisetin H. A dietary antioxidant for health promotion. Antioxid Redox Signal 2013; 19: 151-162.

Khandrika L, Kumar B, Koul S, Maroni P, Koul HK. Oxidative stress in prostate cancer. Cancer Lett 2009; 282: 125-136.

Khokhar S, Apenten RKO. Iron binding characteristics of phenolic compounds: Some tentative structure-activity relations. Food Chem 2003; 81: 133-140.

Khuri FR. Primary and secondary prevention of non-small-cell lung cancer: the SPORE Trials of Lung Cancer Prevention. Clinical Lung Cancer 5 (Suppl. 1) 2003; 36-40.

Kim KH, Tsao R, Yang R, Cui SW. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. Food Chem 2006; 95: 466-473.

Kim WK, Bang MH, Kim ES, Kang NE, Jung KC, Cho HJ, Park JHY. Quercetin decreases the expression of ErbB2 and ErbB3 proteins in HT-29 human colon cancer cells. J Nutr Biochem 2005; 16: 155-162.

King M, Chatelain K, Farris D, Jensen D, Pickup J, Swapp A, et al. Oral squamous cell carcinoma proliferative phenotype is modulated by proanthocyanidins: a potential prevention and treatment alternative for oral cancer. BMC Complement Altern Med 2007; 7: 22.

Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2004; 44: 239-267.

Kleikers PW, Wingler K, Hermans JJ, Diebold L, Altenhöfer S, Radermacher KA, Janssen B, Görlach A, Schmidt HH. NADPH oxidases as a source of oxidative stress and molecular target in ischemia/reperfusion injury. J Mol Med (Berl) 2012; 90: 1391-1406.

- Ko WG**, Kang TH, Lee SJ, Kim YC, Lee BH. Effects of luteolin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human myeloid leukaemia cells. *Phytother Res* 2002;16:295–298.
- Kogiannou DAA**, Kalogeropoulos N, Kefalas P, Polissiou MG, Kaliora AC. Herbal infusions; their phenolic profile, antioxidant and anti-inflammatory effects in HT29 and PC3 cells. *Food Chem Toxicol* 2013; 61: 152-159.
- Kolm RH**, Danielson UH, Zhang Y, Talalay P, Mannervik B. Isothiocyanates as substrates for human glutathione transferases: structure-activity studies. *Biochem J* 1995; 311: 453–459.
- Kovacic P**, Pozos RE, Somanathan R, Shangari N, O'Brien PJ. Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors and toxins: focus on electron transfer, free radicals and structure-activity relationships. *Curr Med Chem* 2005; 12: 2601-2623.
- Kowalski J**, Samojedny A, Paul M, Pietsz G, Wilczok T. Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the expression of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α genes in J774.2 macrophages. *Pharmacol Rep* 2005;57: 390–394.
- Kratchanova M**, Denev P, Ciz M, Lojek A, Mihailov A. Evaluation of antioxidant activity of medicinal plants containing polyphenol compounds. Comparison of two extraction systems. *Acta Bioch Polon* 2010; 57: 229-234.
- Kraus S**, Arber N. Inflammation and colorectal cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2009; 9: 405-410.
- Kris-Etherton PM**, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, Griel AE, Etherton ED. Bioactive Compounds in Foods: Their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. *Am J Med* 2002; 113: 71-88.
- Krishnaiah D**, Sarbatly R, Bono A. Standard Review: Phytochemical antioxidants for health and medicine- A move towards nature. *Biotechnol Mol Biol Rev* 2007; 1: 97-104.
- Kristal AR**, Cohen JH, Qu P, Stanford JL. Associations of energy, fat, calcium, and vitamin D with prostate cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 719-725.
- Kundu JK**, Surh YJ. Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mut Res* 2008; 659: 15-30.
- Kuo PL**, Lin CC. Green tea constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits HepG2 cell proliferation and induces apoptosis through p53-dependent and Fas-mediated pathways. *J Biochem Sci* 2003; 10: 219-227.
- Kushi LH**, Doyle C, McCullough M, et al. American Cancer Society guide-lines on nutrition and physical activity for cancer prevention. *Cancer J Clin* 2012; 62: 30–67.

Kwon KH, Barve A, Yu S, Huang MT, Kong ANT. Cancer chemoprevention by phytochemicals: potential molecular targets, biomarkers and animal models. Invited Review. *Acta Pharmacol Sin* 2007; 28: 1409-1421.

Lacy O' Kennedy R. Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. *Curr Pharmac Des* 2004; 10: 3797-3811.

Lall RK, Syed DN, Vaqar MA, Khqn MI, Mukhtar H. Dietary Polyphenols in prevention and treatment of prostate cancer. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 3350-3376.

Lambert JD, Elias RJ. Review: The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: A role in cancer prevention. *Arch Biochem Biophys* 2010; 501: 65-72.

Lambert JD, Hong J, Yang GY, Liao J, Yang CS. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am J Clin Nutr* 2005; 81:284-291.

Lapornik B, Prosek M, Golc, Wondra A. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J Food Eng* 2005; 71: 214-222.

Lee J. Caffeic acid derivatives in dried Lamiaceae and *Echinacea purpurea* products. *J Func Foods* 2010; 2: 158-162.

Lee JH, Oo Khor T, Shu L, Su ZY, Fuentes F, Kong ANT. Dietary phytochemicals and cancer prevention: NrF2 signaling, epigenetics and cell death mechanisms in blocking cancer initiation and progression. *Pharm Thera* 2013; 137: 153-171.

Lee JY, Li JW, Yeung ES. Single- molecule detection of surface- hybridized human papilloma virus DNA for quantitative clinical screening. *Anal Chem* 2007; 80:83-8089.

Lee KW, Bode AM, Dong Z. Molecular targets of phytochemicals for cancer prevention. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 211-218.

Lee MM, Wang RT, Hsing AW, Gu FL, Wang T et al. Case- control study of diet and prostate cancer in China. *Cancer Causes Control* 1998; 9: 545-552.

Lee WJ, Shim JY, Zhu BT. Mechanisms for the inhibition of DNA methyltransferases by tea

Lenaz G. Mitochondria and reactive oxygen species. Which role in physiology and pathology? *Adv Exp Med Biol* 2012; 942: 93-136.

Lessard L, Begin LR, Gleave ME, Mes-Masson AM, Saad F: Nuclear localisation of nuclear factor-kappaB transcription factors in prostate cancer: an immunohistochemical study. *Br J Cancer* 2005, 93:1019-1023.

Levin B, Lieberman DA, McFarland B, Amdreus KS, Brooks D, Bond J, et al. Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps (2008). A joint guideline from the American cancer society, the US multi-society task force on

colorectal cancer, and the American college of radiology. *J Gastroenterol* 2008; 134: 1570-1595. <http://dx.doi.org/101053/j.gastro.2008.02.002>.

Liang PS, Chen TY, Giovannucci E. Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* 2009; 124: 2406-2415.

Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer- analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med* 2000; 343: 78-85.

Lin HP, Lin CY, Liu CC, Su LC, Huo C, Kuo YY, Tseng JC, HSu JM, Chen CK, Chuu CP. Caffeic acid phenethyl ester as a potential treatment for advanced prostate cancer targeting akk signaling. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 5264-5283.

Lin JT, Chen YC, Lee YC, Rolis Hou CW, Chen FL, Yang DJ. Antioxidant, anti-proliferative and cyclooxygenase-2 inhibitory activities of ethanolic extracts from lemon balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *LTW Food Sci Technol* 2012; 49: 1-7.

Lin WW, Karin MA. Cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation and cancer. *J Clin Invest* 2007; 117: 1175-1183.

Lin Y, Shi R, Wang X, Shen HM. Luteolin, a flavonoid with potentials for cancer prevention and therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2008; 8: 634-646.

Lin YL, Lin JK. (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappaB. *Mol Pharmacol* 1997; 52: 465-472.

Link A, Balaguer F, Goel A. Cancer chemoprevention by Dietary Polyphenols: promising role for epigenetics. *Biochem Pharmacol* 2011; 80: 1771-1792.

Liu G, Chen X. Regulation of the p53 transcriptional activity. *J Cell Biochem* 2006; 97: 448-458.

Liu Q, Cai W, Shao X. Determination of seven polyphenols in water by high performance liquid chromatography combined with preconcentration. *Talanta* 2008; 77: 679-683.

Liu RH. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J Nutr* 2004; 134: 3479-3485.

Liu X, Dong M, Chen X, Jiang M, Lv X, Yan G. Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*. *J Food Chem* 2007; 105: 548-554.

Llana-Ruiz-Cabello M, Gutierrez-Praena D, Pichardo S, Moreno FJ, Bermudez JM, Aucejo S, Camean AM. Cytotoxicity and morphological effects induced by carvacrol and thymol on the human cell line Caco-2. *Food Chem Tox* 2014; 64: 281-290.

- Lochhead P**, Chan AT. Statins and colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013; 11: 109-118.
- Lockshin RA**, Zakeri Z. Apoptosis, autophagy and more. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 2405-2419.
- Loo G**. Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation (Review). *J Nutr Biochem* 2003; 14: 64-73.
- Lopaczynski W**, Zeisel SH. Antioxidants, programmed cell death and cancer. *Nutr Res* 2001; 21: 295-307.
- López V**, Martin S, Gómez-Serranillos MP, Carretero ME, Jäger AK, Calvo MI. Neuroprotective and neurological properties of *Melissa officinalis*, *Neurochem Res*. 2009; 34: 1955–1961.
- López-Jiménez A**, García-Caballero M, Medina MA, Quesada AR. Anti-angiogenic properties of carnosol and carnosic acid, two major dietary compounds from Rosemary. *Eur J Nutr* 2013; 52: 85-95.
- Lopez-Lazaro M**. Distribution and Biological Activities of the Flavonoid Luteolin. *M Rev Med Chem* 2009; 9: 31-59.
- Lu HF**, Chie YJ, Yang MS, Lu KW, Fu JJ, Yang JS et al. Apigenin induces apoptosis in human lung cancer H460 cells through caspase- and mitochondria-dependent pathways. *Hum Exp Toxicol* 2011; 30: 1053-1061.
- Lü JM**, Lin PH, Yao Q, Chen C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med* 2010; 14: 840-860.
- Lu Y**, Foo LY. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chem* 2001; 75: 197-202.
- Ma Y**, Yang Y, Wang F, et al. Obesity and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies. *PLoS One* 2013; 8: e53916.
- Manach C**, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 727-747.
- Mantovani A**, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008; 454: 436-444.
- Mantovani A**, Allavena P, Sozzani S, Vecchi A, Locati M, Sica A. Chemokines in the recruitment and shaping of leukocyte infiltrate of tumors. *Semin Cancer Biol* 2004; 14: 155-160.
- Mantovani A**. Cancer: Inflaming metastasis. *Nature* 2009; 457: 36-37.

- Manukyan A.** Effect of growing factors on productivity and quality of lemon catmint, lemon balm and sage under soilless greenhouse production: I. Drought stress. *Med Arom Plant Sci Biotechnol* 2011; 5: 119-125.
- Martin AR,** Villegas I, Sanchez-Hidalgo M, de la Lastra CA. The effects of resveratrol, a phytoalexin derived from red wines, on chronic inflammation induced in an experimentally induced colitis model. *BR J Pharmacol* 2006; 147: 873-885.
- Massagué J.** G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* 2004; 432: 298-306.
- Mazzanti G,** Battinelli L, Pompeo C, Serrilli AM, Rossi R, Sauzullo I, Mengoni F, Vullo V. Inhibitory activity of *Melissa officinalis* L. extract on Herpes simplex virus type 2 replication. *Nat Prod Res* 2008; 22: 1433-1440.
- McCool KW,** Miyamoto S. DNA damage-dependent NF-kappa B activation: NEMO turns nuclear signaling inside out. *Immunol Rev* 2012; 246: 311-326.
- Meng Q,** Peng Z, Chen L, Si L, Dong Z, Xia Y. Nuclear Factor- κ B modulates cellular glutathione and prevents oxidative stress in cancer cells. *Cancer Lett* 2010; 299: 45-53.
- Merken HM,** Beecher GR. Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography: A review. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 577-599.
- Meyer F,** Bairati I, Jobin E, Gelinat M, Fortin A, Nabid A, et al. Acute adverse effects of radiation therapy and local recurrence in relation to dietary and plasma beta carotene and alpha tocopherol in head and neck cancer patients. *Nutr Cancer* 2007; 59: 29-35.
- Mimica-Dukic N,** Bozin B, Sokovic M, Simin N. Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) Essential Oil. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 2485-2489.
- Mirza A,** Wu Q, Wang L, McClanahan T, Bishop WR, Gheys F, Ding W, Hutchins B, Hockenberry T, Kirschmeier P, Greene JR, Liu S. Global transcriptional program of p53 target genes during the process of apoptosis and cell cycle progression. *Oncogene* 2003; 22: 3645-3654.
- Mocellin MC,** Camargo CQ, Nunes EA, Fiates GMR, Trindade EBSM. A systematic review and meta-analysis of the n-3 polyunsaturated fatty acids effects on inflammatory markers in colorectal cancer. *Clin Nutr* 2015; 1-11, <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2015.04.013>
- Mojzis J,** Varinska L, Mojzisova G, Kostovac I, Mirossaya L. Review: Antiangiogenic effects of flavonoids and chalcones. *Pharmacol Res* 2008; 57: 259-265.
- Montes CL** et al., Tumor-induced senescent T cells with suppressor function: a potential form of tumor immune evasion. *Cancer Res* 2008; 68: 870-879.
- Morson BC.** Evolution of cancer of colon and rectum. *Cancer* 1974; 34: 845-849.

- Moyad MA**, Carroll PR. Lifestyle recommendations to prevent CaP: time to redirect our attention? *Urol Clin North Am* 2004; 31: 289-300.
- Mukherjee PK**, Kumar V, Mal M, Houghton PJ. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomed* 2007; 14: 289-300.
- Murphy C**, McGurk M, Pettigrew J, Santinelli A, Mazzucchelli R, Johnston PG, Montironi R, Waugh DJ: Nonapical and cytoplasmic expression of interleukin-8, CXCR1, and CXCR2 correlates with cell proliferation and microvessel density in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2005, 11:4117-4127.
- Murphy PM**. Chemokines and molecular basis of cancer metastasis. *New Engl J Med* 2001; 354: 833-835.
- Nackz M**, Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chrom A* 2004; 1054: 95-111.
- Nacz M**, Shahidi F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J Pharmaceut Biomed Anal* 2006; 41: 1523-1542.
- Nambiar D**, Singh RP. Advances in prostate cancer chemoprevention: A translational perspective. *Nutr Cancer* 2013; 65: 12-25.
- Naugler WE**, Karin M. The wolf in sheeps clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends Mol Med* 2008; 14: 109-119.
- Neergheen VS**, Baborun T, Taylor EW, Jen LS, Aruoma OI. Targeting specific cell signaling transduction pathways and medicinal phytochemicals in cancer chemoprevention. *Toxicol* 2010; 278: 229-241.
- Nikitovic D**, Corsini E, Kouretas D, Tsatsakis A, Tzanakakis GN. ROS: major mediators of extracellular matrix remodelling during tumor progression 2013 (e-pub).
- Norat T**, Chan D, Lau R, Aune D, Vieira R. The associations between food, nutrition and physical activity and the risk of colorectal cancer. WCRF/AICR systematic literature review continuous update project report. London: World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research; 2010.
- Norouzi M**, Soleimani T, Pasha Zanousi M. Essential oil component in leaf and flower of Lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *Res Pharmaceut Sci* 2012; 7: S749.
- Ogasawara M**, Matsunaga T, Suzuki H. Differential Effects of Antioxidants on the In Vitro Invasion, Growth and Lung Metastasis of Murine Colon Cancer Cells. *Biol Pharmaceut Bulletin* 2007; 30:200-204.

- Ohshima H**, Tazawa H, Sylla BS, Sawa T. Prevention of human cancer by modulation of chronic inflammatory process. *Mutat Res* 2005; 591: 110-122.
- Ondrejovič M**, Kraic F, Benkovičová H, Šilhár S. Optimisation of Antioxidant Extraction from Lemon Balm (*Melissa officinalis*). *Czech J Food Sci* 2012; 30: 385-393.
- Ortega A**, Mena S, Estrela JM. Oxidative and nitrosative stress in the metastatic microenvironment. *Cancers* 2010; 2: 274-304.
- Ortega AL**, Mena S, Estrela JM. Glutathione in Cancer Cell Death. *Cancers* 2011; 3: 1285-1310.
- Palena C**, Hamilton DH, Fernando RI. Influence of IL-8 on the epithelial–mesenchymal transition and the tumor microenvironment. *Fut Oncol* 2012; 8: 713-722.
- Pan MH**, Ghai G, Ho CT. Food bioactives, apoptosis and cancer (Review). *Mol Nutr Food Res* 2008; 52: 43-52.
- Pan MH**, Ghai G, Ho CT. Food bioactives, apoptosis and cancer. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52: 43-52.
- Pan MH**, Lai CS, Hsu PC, Wang YJ et al. Acacetin induces apoptosis in human gastric carcinoma cells accompanied by activation of caspase cascades and production of reactive oxygen species. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 620-630.
- Pandey M**, Kaur P, Shukla S, Abbas A, Fu P, Gupta S. Plant flavones apigenin inhibits HDAC and remodels chromatin to induce growth arrest and apoptosis in human prostate cancer cells: in vitro and in vivo study. *Mol Carcinog* 2012; 51: 952-962.
- Park SY**, Murphy SP, Wilkens LR, Henderson BE, Kolonel LN. Fat and meat intake and prostate cancer risk: the multiethnic cohort study. *Int J Cancer* 2007; 121: 1339-1345.
- Patel PS**, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. Regulation of constitutive and induced NF-kappaB activation in malignant melanoma cells by capsaicin modulates interleukin-8 production and cell proliferation. *J Interferon Cytokine Res* 2002; 22: 427-435.
- Patora J**, Klimek B. Flavonoids from lemon balm (*Melissa officinalis* L. Lamiaceae). *Pol Pharmaceut Soc* 2002; 59: 139-143.
- Patora J**, Majda T, Gora J, Klimek B. Variability in the content and composition of essential oil from Lemon balm (*Melissa officinalis* L.) cultivated in Poland. *Acta Pol Pharm Drug Res* 2003; 60: 395-400.
- Patterson RE**, Cadmus LA, Emond JA, Pierce JP. Physical activity, diet, adiposity and female breast cancer prognosis: a review of the epidemiologic literature. *Maturitas* 2010; 66: 5-15.

Peng Z, Geh E, Chen L, Meng Q, Fan Y, Sartor HG, Shertrez ZG, Liu A, Puga Y, Xia Y. Inhibitor of (κ)B kinase (β) regulates redox homeostasis by controlling the constitutive levels of glutathione. *Mol Pharmacol* 2010; 70: 784-792.

Pereira RP, Boligon AA, Appel AS, Fachinetto R, Ceron CS, Tanus-Santos JE, Athayde ML, Rocha JBT. Chemical composition, antioxidant and anticholinesterase activity of *Melissa officinalis*. *Ind Crop Prod* 2014; 53: 34-45.

Pereira RP, Fachinetto R, de Souza Prestes A, Puntel RL, da Silva GNS, Heinzmann BM, Boschetti TK, Athayde ML, Bürger ME, Morel AF, Morsch VM, Rocha JBT. Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citrates*. *Neurochem Res* 2009; 34: 973-983.

Pérez- Jiménez J, Neveu V, Vos F, Scalbert A. Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol- Explorer database. *Eur J Clin Nutr* 2010; 64: 112-120.

Perkins N, Gilmore T. Good cop, bad cop: The different faces of NF- κ B. *Cell Death Differ* 2006; 1: 1-14.

Perrera PS, Thompson RL, Weseman MJ. Recent evidence for colorectal cancer prevention through healthy food, nutrition, and physical activity: implications for recommendations. *Curr Nutr Rep* 2012; 1: 44-54.

Perron NR, Brumaghim JL. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem Biophys* 2009; 53: 75-100.

Pierzchalski P, Krawiec A, Gawelko J, Pawlik WW, Konturek SJ, Gonciaz M. Molecular mechanism of protection against chemically and gamma- radiation induced apoptosis in human colon cancer cells. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59: 191-202.

Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 2000; 63: 1035-1042.

Platz EA, De Marzo AM. Epidemiology of Inflammation and Prostate Cancer. *J Urol* 2004; 171: 36-40.

Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 1499-1503.

Popa V, Agache C, Beleca C, Popa M. Polyphenols from spruce bark as plant growth regulator. *Crop Res* 2002; 24: 398-406.

Porath D, Riegger C, Drewe J, Schwager J. Epigallocatechin-3-gallate impairs chemokine production in human colon epithelial cell lines. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315: 1172-1180.

- Porter LJ.** Tannins. In J B. Harborne (Ed.) Methods in plant biochemistry (Vol.1). Plant phenolics (pp. 389-419). London. Academic Press.
- Poulsen HE,** Prieme H, Loft S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. *Eur J Cancer Prev* 1998; 71: 9-16.
- Poyton RO,** Ball KA, Castello PR Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol Metab* 2009; 20: 332-340.
- Pozo-Guisado E,** Alvarez-Barrientos A, Mulero-Navarro S, et al. The antiproliferative activity of resveratrol results in apoptosis in MCF-7 but not in MDA-MB-231 human breast cancer cells: cell specific alteration of the cell cycle. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 1375-1386.
- Prasad R,** Katiyar SK. Bioactive phytochemical proanthocyanidins inhibit growth of head and neck squamous cell carcinoma cells by targeting multiple signaling molecules. *PLoS One* 2012; 7: e46404.
- Proestos C,** Chorianopoulos N, Nychas GJE, Komaitis M. RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 1190-1195.
- Psotová J,** Lasovský J, Vičar J. Metal chelating properties, electrochemical behavior, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics. *Biomed Papers* 2003; 147: 147-153.
- Rahman I,** Biswas SK, Kirkham PA. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem Pharmacol* 2006; 72: 1439-1452.
- Ralston RA,** Truby H, Palermo CE, Walker KZ. Colorectal cancer and non-fermented milk, solid cheese, and fermented milk consumption: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2014; 54: 1167-79.
- Ramos S.** Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52: 507-526.
- Ramos S.** Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J Nutr Biochem* 2007; 18: 427-442.
- Ramos S.** Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention *J Nutr Biochem* 2007; 18: 427-442.
- Rao AV,** Rao GL. Carotenoid and human health. *Pharmacol Res* 2007; 55: 207-216.
- Rao CV,** Kawamori T, Hamid R, Reddy BS. Chemoprevention of colonic aberrant crypt foci by an inducible nitric oxide synthase-selective inhibitor. *Carcinogenesis* 1999; 20: 641-644.

- Rao RV**, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death* 2004; 11: 372-380.
- Raposo CG**, Carpeno JD, Baron MG. Causes of lung cancer: smoking, environmental tobacco smoke exposure, occupational and environmental exposures, and genetic predisposition. *Med Clin* 2007; 128: 390-396.
- Rattan RS**. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Prot* 2010; 29: 913-20.
- Reed TT**. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. *Free Rad Biol Med* 2011; 51: 1302-1319.
- Reidy J**, McHugh E, Stassen LFA. A review of the relationship between alcohol and oral cancer. *Surgeon* 2011; 9: 278-83.
- Reuter S**, Eifes S, Dicato M, Aggarwal BB, Diedrich M. Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2008; 76: 1340-1351.
- Reuter S**, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation and cancer: How are they linked? *Free Rad Biol Med* 2010; 49: 1603-1616.
- Ricci JE**, Munoz-Pinedo C, Fitzgerald P, Bailly-Maitre B et al., Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell* 2004; 117: 773-786.
- Riccioni G**. Carotenoids and Cardiovascular Disease. *Cur Ather Rep* 2009; 11: 434-439.
- Rice-Evans CA**, Miller NJ, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* 1997; 2: 152-159.
- Rice-Evans CA**, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 933-956.
- Robbins RJ**. Phenolic acids in food: An overview of analytical methodology. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 2866-2887.
- Rodrigo R**, Prieto JC, Castillo R. Cardioprotection against ischaemia/reperfusion by vitamins C and E plus n-3 fatty acids: molecular mechanisms and potential clinical applications. *Clin Sci (Lond)* 2013; 124: 1-15.
- Rohan TE**, Howe GR, Burch JD, Jain M. Dietary factors and risk of prostate cancer: a case-control study in Ontario, Canada. *Cancer Causes Control* 1995; 6: 145-154.
- Rohmer M**. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat Prod Rep* 1999; 16: 565-74.

Rollins BJ. Inflammatory chemokines in cancer growth and progression. *Eur J Cancer* 2006; 42: 760-767.

Romaneiro S, Parekh N. Dietary fiber intake and colorectal cancer risk. *Top Clin Nutr* 2012; 27(1): 41-7.

Rostami H, Kazemi M, Safiei S. Antibacterial activity of *Lavandula officinalis* and *Melissa officinalis* against some human pathogenic bacteria. *Asian J Biochem* 2012; 7:133-142.

Rowe Chuang. An overview of pathways regulating apoptosis. *Exp Rev Mol Med* 2004; 6.

Rubie C, Frick VO, Pfeil S, Wagner M, Kollmar O, Kopp B, Graber S, Rau BM, Schilling MK: Correlation of IL-8 with induction, progression and metastatic potential of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2007, 13:4996-5002.

Rusak G, Komes D, Likic S, Horzic H, Kovac M. Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chem* 2008; 110: 852-858.

Sadraei H, Ghannadi A, Maleksahi K. Relaxant effect of essential oil of *Melissa officinalis* and citral on rat ileum contractions, *Fitoterapia* 2003; 74: 445-452.

Saeb K, Gholamrezaee S. Variation of essential oil composition of *Melissa officinalis* L. leaves during different stages of plant growth. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; 2: 547-549.

Saldanha AN, Kala R, Tollefsbol TO. Molecular mechanisms for inhibition of colon cancer cells by combined epigenetic-modulating epigallocatechin gallate and sodium butyrate. *Exp Cell Res* 2014; 324: 40-53.

Saleem M, Kim HJ, Ali MS, Lee YS. An update on bioactive plant lignans. *Nat Prod Rep* 2005; 22: 696-716.

Santangelo C, Vari R, Scazzocchio B, Benedetto RD, Filesi C, Masella R. Polyphenols, intracellular signaling and inflammation. *Ann Ist Super Sanita* 2007; 43: 394-405.

Santos-Neto LL, Toledo MAV, Medeiros- Souza P, Souza GA. The use of herbal medicine in Alzheimer's disease- a systematic review. *Adv Acc Public* 2006; 23: 441-445.

Saraydin SU, Tuncer E, Tepe B, Karadayi S, Ozer H, Sen M, Karadayi K, Inan D, Elagoz S, Polat Z, Duman M, Turan M. Antitumoral effects of *Melissa officinalis* on breast cancer in vitro and in vivo. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13: 2765-2770.

Sari AO, Ceylan A. Yield characteristics and essential oil composition of Lemon balm (*Melissa officinalis* L.) grown in the Aegean region of Turkey. *Turk J Agric For* 2002; 26: 217-224.

- Schaid DJ**. The complex genetic epidemiology of prostate cancer. *Human Mol Genetics* 2004; 13: 103-121.
- Schmid HP**, Engeler DS, Pummer K, Schmitz-Dräger BJ. Prevention of prostate cancer: more questions than data. *Recent Results Cancer Res* 2007; 174: 101-107.
- Seaton A**, Scullin P, Maxwell PJ, Wilson C, Pettigrew J, Gallagher R, O'Sullivan JM, Johnston PG, Waugh DJJ. Interleukin-8 signaling promotes androgen-independent proliferation of prostate cancer cells via induction of androgen receptor expression and activation. *Carcinogenesis* 2008; 29: 1148-1156.
- Seo YJ**, Kim BS, Chun SY, Park YK, Kang KS, Kwon TG. Apoptotic effects of genistein, biochanin-A and apigenin on LNCaP and PC3 cells by p21 through transcriptional inhibition of polo-like kinase-1. *J Korean Med Sci* 2011; 26: 1489-1494.
- Serafini M**, Peluso I, Raguzzini A. Session 1: Antioxidants and the immune system. Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proc Nutr Soc* 2010; 69: 273-278.
- Seruga B**, Zhang H, Bernstein LJ, Tannock IF. Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 887-899.
- Shahidi F**, Ho CT. Food factors in health promotion and disease prevention. In: Shahidi F, Ho CT, Watanabe S, Osawa T. (Eds), *Food Factors in Health Promotion and Disease Prevention*, ACS Symposium Series 851, American Chemical Society, Washington DC 2003; pp: 2-7.
- Shahidi F**, Ho CT. Food factors in health promotion and disease prevention. In: Shahidi F, Ho CT, Watanabe S, Osawa T (Eds), *Food factors in health promotion and disease prevention*, ACS Symposium series 851, American Chemical Society, Washington D.C. 2003, pp 2-7.
- Shamas-Din A**, Kale J, Leber B, Andrews DW. Mechanisms of Action of Bcl-2 Family Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5: a008714.
- Shankar S**, Singh G, Srivastava RK. Chemoprevention by resveratrol: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Front Biosci* 2007; 12: 4839–4854.
- Sharopov FS**, Wink M, Khalifaev DR, Zhang H, Dosoky NS, Setzer WN. Composition and bioactivity of the essential oil of *Melissa officinalis* L growing in Tajikistan. *Int J Trad Nat Med* 2013; 2: 86-96.
- Shaulian E**, Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 2001; 20: 2390-2400.

Shemann M, Michel K, Zeller F, Hohenester B, Rühl A. Region- specific effects of STW 5 (Iberogast) and its components in gastric fundus, corpus and antrum. *Phytomed* 2006; 13: 90-99.

Shen F, Chen SJ, Dong XJ, Zhong H, Li YT, Cheng GF. Suppression of IL-8 gene transcription by resveratrol in phorbol ester treated human monocytic cells. *J Asian Natl Prod Res* 2003; 5: 151-157.

Shen F, Chen SJ, Dong XJ, Zhong H, Li YT, Cheng GF. Suppression of IL-8 gene transcription by resveratrol in phorbol ester treated human monocytic cells. *J Asian Natl Prod Res* 2003; 5: 151–157.

Sherr CJ. Principles of tumor suppression. *Cell* 2004; 116: 235-246.

Shetter AJ, Heegaard NHH, Harris CC. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis* 2010; 31: 37-49.

Shi MD, Shiao CK, Lee YC, Shih YW. Apigenin, a dietary flavonoid, inhibits proliferation of human bladder cancer T-24 cells via blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. *Cancer Cell Inter* 2015; 15: 33.

Shimizu M, Deguchi A, Lim JT, Moriwaki H, Kopelovich L et al., (-)Epigallocatechin gallate and polyphenon E inhibit growth and activation of the epidermal growth factor receptor and human epidermal factor receptor-2 signaling pathways in human colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2735-2746.

Shiotani A, Iishi H, Uedo N, Ishiguro S, Tatsuta M, et al. Evidence that loss of sonic hedgehog is an indicator of Helicobacter pylori- induced atrophic gastritis progressing to gastric cancer. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 581-587.

Shirakami Y, Sakai H, Kubota M, Kochi T, Shimizu M. Dietary phytochemicals as cancer preventive agents: efficacy and mechanisms. *J Bioanal Biomed* 2015; 7: 2.

Shishodia S, Aggarwal BB. Nuclear factor- κ B: a friend or a foe in cancer? *Biochem Pharmacol* 2004; 68: 1071-1080.

Shishodia S, Majumdar S, Banerjee S, Aggarwal BB. Ursolic Acid Inhibits Nuclear Factor- κ B Activation Induced by Carcinogenic Agents through Suppression of I κ B α Kinase and p65 Phosphorylation Correlation with Down-Regulation of Cyclooxygenase 2, Matrix Metalloproteinase 9, and Cyclin D1. *Cancer Res* 2003; 63: 4375-4383.

Shishodia S, Sethi G, Aggarwal BB. Curcumin: getting back to the roots. *Ann NY Acad Sci* 2005; 1056: 206-217.

Siah CW, Trinder D, Olynyk JK. Iron overload. *Clin Chim Acta* 2005; 358: 24–36.

- Siegel R**, DeSantis C, Virgo K, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; 62: 220-241.
- Simmen U**, Kelber O, Okpaneji SN, Jaeggi R, Buetler B, Weiser D. Binding of STW 5 (Iberogast) and its components to intestinal 5-HT, muscarinic M3 and opioid receptors. *Phytomed* 2006; 13: 51-55.
- Singh RP**, Dhanalakshmi S, Agarwal R. Review: Phytochemicals as Cell Cycle Modulators A Less Toxic Approach in Halting Human Cancers. *Cell Cycle* 2002; 1: 155-160.
- Skinnider BF**, Mak TW. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2002; 99: 4283-4297.
- Skotti E**, Anastasaki E, Kanellou G, Polissiou M, Tarantilis PA. Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants. *Ind Crop Prod* 2014; 53: 46-54.
- Slattery ML**, Fitzpatrick FA. Convergence of hormones, inflammation, and energy-related factors: a novel pathway of cancer etiology. *Cancer Prev Res* 2009; 2: 922-30.
- Smolinska K**, Paluszkiwicz P. Risk of colorectal cancer in relation to frequency and total amount of red meat consumption. Systematic review and meta-analysis. *Arch Med Sci* 2010; 6(4): 605-10.
- Smyth T**, Ramachandrian VN, Smyth WF. A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. *Int J Antimicrob Ag* 2009; 33: 421-426.
- Soliman KF**, Mazzio EA. In vitro attenuation of nitric oxide production in C6 astrocyte cell culture by various dietary compounds. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998; 218: 390-397.
- Sonnenberg A**, Genta RM. *Helicobacter pylori* is a risk factor for colonic neoplasms. *Am J Gastroenterol* 2013; 108: 208-215.
- Soobrattee MA**, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanisms and actions. *Mut Res* 2005; 579: 200-213.
- Sparmann A**, Bar-Sagi D. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell* 2004; 6: 447-458.
- Spencer J**, Rice-Evans C, Williams R. Modulation of pro-survival Akt/protein kinase B and ERK1/2 signaling cascades by quercetin and its in vivo metabolites underlie their action on neuronal viability. *J Biol Chem* 2003; 278: 34783-34793.
- Spencer JPE**. Beyond antioxidants: the cellular and molecular interactions of flavonoids and how these underpin their actions on the brain. *Proc Nutr Soc* 2010; 69: 244-260.

- Sporn MB**, Dunlop NM, Newton DL, Smith JM. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Fed Proceed* 1976; 35: 1332-1338.
- Sporn MB**, Suh N. Chemoprevention: an essential approach to controlling cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 537-543.
- Srivastava J**, Lambert J, Vietmeyer N. Medicinal Plants: An expanding role in development. 1996; World Bank Technical Paper
- Stagos D**, Portesis N, Spanou C, Mossialos D, Aligiannis N, Chaita E, Panagoulis C, Reri E, Skaltsounis L, Tsatsakis AM, Kouretas D. Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. *Food Chem Toxicol* 2012; 50: 4115–4124.
- Stanley LA**. Molecular aspects of chemical carcinogenesis: the roles of oncogenes and tumour suppressor genes. *Toxicology* 1995, 96, 173-194.
- Steeghs M**, Bais HP, de Gouw J, Goldan P, Kuster W, Northway M, Fall R, Vivanco JM. Proton- transfer- reaction mass spectrometry (PTR-MS) as a new tool for real time analysis of root-secreted volatile organic compounds (VOCs) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 2004; 135: 47–58.
- Su ZY**, Shu L, Khor TO, Lee JH, Fuentes F, Kong ANT. A Perspective on Dietary Phytochemicals and Cancer Chemoprevention: Oxidative stress, Nrf2 and Epigenomics. *Top Curr Chem* 2013; 329: 133-162.
- Subbaramaiah K**, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24: 96-102.
- Surh YJ**, Kumar Kundu J, Na HK, Lee JS. Redox-Sensitive Transcription Factors as Prime Targets for Chemoprevention with Anti-Inflammatory and Antioxidative Phytochemicals. *J Nutr* 2005; 135: 2993-3001.
- Surh YJ**. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 768-780.
- Suvarnakuta P**, Chaweerungrat C, Devahastin S. Effects of drying methods on assay and antioxidant activity of xanthonenes in mangosteen rind. *Food Chem* 2011; 125: 240-247.
- Syed DN**, Khan N, Afaq F, Mukhtar H. Chemoprevention of prostate cancer through dietary agents: Progress and promise. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2007; 16: 2193-2203.
- Szliszka E**, Zydowicz G, Janoszka B, Dobosz C, Kowalczyk-Ziomek G, Krol W. Ethanolic extract of Brazilian green propolis sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *Int J Oncol* 2011; 38: 941-953.

Tabor E. Pathogenesis of hepatitis B virus- associated hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2007; 37: 110-114.

Taherpour AA, Maroofi H, Rafie Z, Larijani K. Chemical composition analysis of the essential oil of *Melissa officinalis* L. from Kurdistan. Iran by HS/SPME method and calculation of the biophysicochemical coefficients of the components. *Nat Prod Res* 2012; 26: 152-160.

Tanaka T, Tanaka T, Tanaka M. Potential Cancer Chemopreventive Activity of Protocatechuic Acid. *J Exp Clin Med* 2011; 3: 27-33.

Tanimura S, Kadomoto R, Tanaka T, Zhang YZ, Kouno I, Kohno M. Suppression of tumor cell invasiveness by hydrolyzable tannins (plant polyphenols) via the inhibition of matrix metalloproteinase-2/-9 activity

Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomed Pharmacother* 2004; 58: 100-110.

Tárraga López PJ, Albero JS, Rodríguez-Montes JA. Is it possible to reduce the incidence of colorectal cancer by modifying diet and lifestyle? *Curr Cancer Ther Rev* 2013; 9 (3).

Tárraga López PJ, Albero JS, Rodríguez-Montes JA. Primary and secondary prevention of colorectal cancer. *Clin Med Insights: Gastroenterol* 2014; 7: 33–46.

Taylor DP, Burt RW, Williams MS, Haug PJ. Cannon- Albright LA. Population- based family history- specific risks for colorectal cancer: a constellation approach. *J Gastroenterol* 2010; 138: 877-885.

Teiten et al. 2013

Teiten MH, Gaascht F, Dicato M, Diedrich M. Anticancer bioactivity of compounds from medicinal plants used in European medieval traditions. *Biochem Pharmacol* 2013; 86: 1239-1247.

Terada H, Urano T, Konno H: Association of interleukin-8 and plasminogen activator system in the progression of colorectal cancer. *Eur Surg Res* 2005, 37:166-172.

The European Scientific Cooperative on Phytotherapy, ESCOP monography, 2003. <http://books.google.pl/books?id=xPnuDwUOq4C&pg=PA328&lpg=PA328&dq=ESCOP+melissa+officinalis&source=bl&ots=ctaK4ghB7h&sig=Ps4gl1DdmUqRULrevwLksfTpmis&hl=it&sa=X&ei=giFUMHwOZDAswaNzoH4DA&rediresc=y#v=onepage&q=ESCOP%20melissa%20officinalis&f=false> (accessed October 2012)

Theodoratou E, Kyle J, Cetnarskyj R, Farrington SM, Tenesa A, Barnetson R, Porteous M, Dunlop M, Campbell H. Dietary Flavonoids and the Risk of Colorectal Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 684-693.

Timothy WM, Charles DJ, David MB. Reaction of OH-radicals with H₂ in sub-critical water. *Chem Phys Lett* 2003; 7: 144-149.

Tolba MF, Esmat A, Al-Abd AM, Azab SS, Khalifa AE, Mosli HA, Abdel-Rahman SZ, Abdel-Naim AB. Caffeic acid phenethyl ester synergistically enhances docetaxel and paclitaxel cytotoxicity in prostate cancer cells. *IUBMB Life* 2013; 65: 716-729.

Tomas-Barberan FA, Ferreres F, Gil MI. Antioxidant phenolic metabolites from fruit and vegetables and changes during postharvest storage and processing. In: Rahman A (Ed). *Bioactive natural products (Part D)* 2000; 739-795.

Tomkins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 2005; 310: 644-648.

Torbeyns T. Correlates of changes in Body Mass Index and Fat Percentage in students after 1.5 years at University. 2012- 2013.

Tsai SH, Lin-Shiau SY, Lin JK. Suppression of inducible nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NF-kappa B in macrophages by resveratrol. *Br J Pharmacol* 1999; 126: 673-680.

Tsao R, Yang R. Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: Towards a total phenolic index using high performance liquid chromatography. *J Chrom A* 2003; 1018: 29-40.

Tsao R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutr* 2010; 2: 1231-1246.

Ulbricht C, Brendler T, Gruenwald J, Kligler B, Keifer D, Abrams TR, Woods J, Boon H, Kirkwood CD, Hackman DA, Basch E, Lafferty HJ. Lemon balm (*Melissa officinalis* L.): an evidence-based systematic review by the Natural Standard Research Collaboration. *J Herb Pharmacother* 2005; 5: 71-114.

Ulrich S, Wolter F, Stein JM. Molecular mechanisms of the chemopreventive effects of resveratrol and its analogs in carcinogenesis. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49: 452-461.

Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004; 266: 37-56.

- Valko M**, Liebfriz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
- Valko M**, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biol Inter* 2006; 160: 1-40.
- van Erk MJ**, Roepman P, van der Lende TR, Stierum RH, Aarts JMMJG, van Bladeren PJ, van Ommen B. Integrated assessment by multiple gene expression analysis of quercetin bioactivity on anticancer-related mechanisms in colon cancer cells in vitro. *Eur J Nutr* 2005; 44: 143-156.
- van Zandwijk N**, Hirsch FR. Chemoprevention of lung cancer: current status and future prospects. *Lung Cancer* 2003; 42 (Suppl. 1): 71-79.
- Vanamala J**, Reddivari L, Radhakrishnan S, Tarver C. Resveratrol suppresses IGF-1 induced human colon cancer cell proliferation and elevates apoptosis via suppression of IGF-1R/Wnt and activation of p53 signaling pathways. *BMC Cancer* 2010; 10: 238.
- Vance TM**, Su J, Fontham ET, Koo SI, Chun OK. Dietary antioxidants and prostate cancer: A review. *Nutr Cancer* 2013; 65: 793-801.
- Vargas AJ**, Thompson PA. Diet and nutrient factors in colorectal cancer risk. *Nutr Clin Pract* 2012; 27(5): 613-23.
- Vauhkonen H**, Bohling T, Elissa S, Shoman S, Knuutila S. Can bladder adenocarcinomas be distinguished from schistostomiasis-associated bladder cancers by using array comparative genomic hybridization analysis? *Cancer Genet Cytogen* 2007; 177: 153-157.
- Vauzour D**, Rodriguez-Mateos A, Corona G, Oruna-Concha MJ, Spencer JPE. Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients* 2010; 2: 1106-31.
- Venardos KM**, Perkins A, Headrick J, Kaye DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury, antioxidant enzyme systems, and selenium: a review. *Curr Med Chem* 2007; 14: 1539-1549.
- Vendramini-Costa DB**, Carvalho JE. Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. *Cur Pharmaceut Des* 2012; 18: 3831-3852.
- Verma RS**, Padalia RC, Chauhan A. Evaluation of essential oil quality of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) grown in two locations of northern India. *J Es Oil Res* 2015; 27: 412-416.

Veskoukis AS, Kyparos A, Nikolaidis MG, Stagos D, Aligiannis N, Halabalaki M, Chronis K, Goutzourelas N, Skaltsounis L, Kouretas D. The antioxidant effects of a polyphenol-rich grape pomace extract in vitro do not correspond in vivo using exercise as an oxidant stimulus. *Oxid Med Cell Longev* 2012; 1–14.

Vicari AP, Caux C. Chemokines in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13: 143-145.

Vijayababu M, Kanagaraj P, Arunkumar A, Ilangovan R, Aruldas M, Arunakaran J. Quercetin-induced growth inhibition and cell death in prostatic carcinoma cells (PC-3) are associated with increase in p21 and hypophosphorylated retinoblastoma proteins expression *J Cancer Res Clin Oncol*, 2005; 131: 765–771.

Visanji JM, Thompson DG, Padfield PJ. Induction of G2/M phase cell cycle arrest by carnosol and carnosic acid is associated with alteration of cyclin A and cyclin B1 levels. *Cancer Lett* 2006; 237:130-136.

Visconti R, Grieco D. New insights on oxidative stress in cancer. *Curr Opin Drug Discov Dev* 2009; 12: 240-245.

Visioli F, de La Lastra CA, Andres- Lacueva C, Aviram M, Calhau C, Cassano A, D' Archivio M, Faria A, Favé G, Fogliano V. Polyphenols and human health: a prospectus. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2011; 51: 524-546.

Voboril R, Voborilova J, Rychterova V, Jirasek T, Dvorak J: Dissociated invasively growing cancer cells with NF-kappaB/p65 positivity after radiotherapy: a new marker for worse clinical outcome in rectal cancer? Preliminary data. *Clin Exp Metastasis* 2008, 25:491-496.

Vurusaner B, Poli G, Basaga H. Review Article: Tumor suppressor genes and ROS: complex networks of interactions. *Free Rad Biol Med* 2012; 52: 7-18.

Vurusaner B, Poli G, Basaga H. Review Article: Tumor suppressor genes and ROS: complex networks of interactions. *Free Rad Biol Med* 2012; 52: 7-18.

Waleh NS, Chao WR, Bensari A, Zaveri NT. Novel D-ring analog of epigallocatechin-3-gallate inhibits tumor growth and VEGF expression in breast carcinoma cells. *Anticancer Res* 2005; 25 :397–402

Wang S, Meckling KA, Marcone MF, Kakuda Y, Tsao R. Review: Can phytochemical antioxidant rich foods act as anti-cancer agents? *Food Res Int* 2011; 4: 2545-2554.

Wang SY, Zheng W. Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in Strawberry. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 4977-4982.

WCRF/AICR: Colorectal Cancer Report. Food, nutrition, physical activity and the prevention of colorectal cancer 2011. This report provides the recent evidence on colorectal cancer from the Continuous Update Project.

Weber AA, Neuhaus T, Skach RA, Hescheler J, Ahn HY, Schror K, et al. Mechanisms of the inhibitory effects of epigallocatechin-3 gallate on platelet-derived growth factor-BB-induced cell signaling and mitogenesis. *FASEB J* 2004; 18: 128–130.

Weidner C, Rousseau M, Plauth A, Wowro SJ, Fischer C, Abdel-Aziz H, Sauer S. Melissa *officinalis* extract induces apoptosis and inhibits proliferation in colon cancer cells through the formation of reactive oxygen species. *Phymed* 2015; 22: 262-270.

Weng CJ, Yen GC. Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: Phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. *Cancer Treat Rev* 2012; 38: 76-87.

WHO Database. 20036. World Health Organization. Fact Sheet number 134. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/print.html>

WHO monographs on selected medicinal plants, Geneva, 2004. <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js4927e/18.html#Js4927e.18> (accessed October 2012).

Wooton- Beard PC, Ryan L. Improving public health? The role of antioxidant- rich fruit and vegetable beverages. *Food Res Int* 2011; 44: 3135-3148.

Wu S, Feng B, Li K, et al. Fish consumption and colorectal cancer risk in humans: a systematic review and meta-analysis. *Am J Med* 2012; 125: 551–59.

Wu TJ, Sempos CT, Freudenheim JL, Muti P, Smith E. Serum iron, copper and zinc concentrations and risk of cancer mortality in US adults. *Ann Epidemiol* 2004; 14: 195–201.

Xavier CPR, Lima CF, Rohde M, Pereira-Wilson C. Quercetin enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis in MSI colorectal cancer cells through p53 modulation. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011; 68: 1449-1457.

Xia J, Song X, Bi Z, Chu W, Wan Y. UV-induced NF-kappaB activation and expression of IL-6 is attenuated by (-)-epigallocatechin-3-gallate in cultured human keratinocytes in vitro. *Int J Mol Med* 2005; 16: 943–950.

Xu BJ, Chang SK. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *J Food Sci* 2007; 72: 159-166.

Yanez J, Vicente V, Alcaraz M, Castillo J, Benavente-Garcia O, Canteras M et al. Cytotoxicity and antiproliferative activities of several phenolic compounds against three melanocytes cell lines: relationship between structure and activity. *Nutr Cancer* 2004; 49: 191-199.

Yang F, Oz HS, Barve S, de Villiers WJ, McClain CJ, Varilek GW. The green tea polyphenols (-)-epigallocatechin-3-gallate blocks nuclear factor-kappa B activation by inhibiting I kappa B kinase activity in the intestinal epithelial cell line IEC-6. *Mol Pharmacol* 2001; 60: 528-533.

Ye L, Zhang Y. Total intracellular accumulation levels of dietary isothiocyanates determine their activity in elevation of cellular glutathione and induction of phase 2 detoxification enzymes. *Carcinogenesis* 2001; 22: 1987-1992.

Yin MC, Lin CC, Wu HC, Tsao SM, Hsu CK. Apoptotic effects of protocatechuic acid in human breast, lung, liver, cervix and prostate cancer cells: Potential mechanisms of action. *J Agric Food Chem* 2009; 57: 6568-6473.

You BR, Park WH. Gallic acid-induced lung cancer cell death is related to glutathione depletion as well as reactive oxygen species increase. *Toxicol in vit* 2010; 24: 1356-1362.

Young GP, Hu Y, Le Leu RK, Nyskohus L. Dietary fibre and colorectal cancer: A model for environment- gene interactions. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49: 571-584.

Young GP, Hu Y, Le Leu RK, Nyskohus L. Dietary fibre and colorectal cancer: s model for environment-gene interactions. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49: 571-584.

Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 798-809.

Yusof AS, Isa ZMd, Shah SA. Dietary patterns and risk of colorectal cancer: a systematic review of cohort studies (2000-2011). *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13: 4713-4717.

Zadernowski R, Czaplicki S, Nackz M. Phenolic acid profiles of mangosteen fruits (*Garcinia mangostama*). *Food Chem* 2009; 112: 685-689.

Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: How Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 67-71.

Zargari AI. Medicinal plants. Tehran: Tehran University Press, 1990; 1: 77-87.

Zenk MH, Juenger M. Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochem* 2007; 68: 2757-2772.

Zgórka G, Glowniak K. Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. *J Pharmaceut Biomed Anal* 2006; 26: 79-87.

Zhou K, Yu L. Effects of extraction solvent on wheat antioxidant activity estimation. *Lebens Wissen Techn* 2004; 37: 717-721.

Zhu YM, Webster SJ, Flower D, Woll PJ. Interleukin-8 /CXCL8 is a growth factor for human lung cancer cells. Br J Cancer 2004; 91: 1970-1976.

Zulak K, Liscombe D, Ashihara H, Facchini P. Alkaloids. Plant secondary metabolism in diet and human health. Oxford: Blackwell Publishing; 2006; p. 102–36.

BIBΛΙΑ

Χημεία Τροφίμων, Ε' Έκδοση. Δ. **Μπόσκου, 2004**. Σελίδες: 221-227. Εκδόσεις Γαρταγάνη.