ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Προσδιορισμός δευτερογενών μεταβολιτών σε αφεψήματα βοτάνων της Ελληνικής χλωρίδας και αξιολόγηση της βιοδραστικότητάς τους

Διδακτορική Διατριβή

Δήμητρα Κογιάννου
Βιολόγος, MSc

Αθήνα, 2016

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Η Διδακτορική Διατριβή εξετάστηκε από την κάτωθι Επταμελή Επιτροπή:

Νικόλαος Καλογερόπουλος (Επιβλέπων)
Αναπληρωτής Καθηγητής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Ανδριάνα Καλιώρα
Επίκουρη Καθηγήτρια, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Μόσχος Πολυσίου
Ομότιμος Καθηγητής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Γιώργος Δεδούσης
Καθηγητής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Αλέξιος Λέανδρος Σκαλτσούνης
Καθηγητής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Χάρης Πρατσίνης
Ερευνητής Γ', Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος»

Παναγιώτης Ζουμπουλάκης
Ερευνητής Γ', Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου δεν υποδηλώνει και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα

Η Δήμητρα Κογιάννου

δηλώνω υπεύθυνα ότι:

1) Είμαι ο κάτοχος των πνευματικών δικαιωμάτων της πρωτότυπης αυτής εργασίας και από όσο γνωρίζω η εργασία μου δε συκοφαντεί πρόσωπα, ούτε προσβάλει τα πνευματικά δικαιώματα τρίτων.

2) Αποδέχομαι ότι η ΒΚΠ μπορεί, χωρίς να αλλάξει το περιεχόμενο της εργασίας μου, να τη διαθέσει σε ηλεκτρονική μορφή μέσα από τη ψηφιακή Βιβλιοθήκη της, να την αντιγράψει σε οποιοδήποτε μέσο ή/και σε οποιοδήποτε μορφότυπο καθώς και να κρατά περισσότερα από ένα 087 αντίγραφα για λόγους συντήρησης και ασφάλειας.

Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας-Φυσικοχημείας-Βιοχημείας Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Νικόλαου Καλογερόπουλου.

Μετά την ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Επιβλέποντά μου κ. Νικόλαο Καλογερόπουλο, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάθεση της παρούσας διατριβής. Σε όλο το χρονικό διάστημα διεξαγωγής της μελέτης ήταν εξαιρετικός επιστημονικός υπεύθυνος και πάντα πρόθυμος να μου μεταδώσει τις γνώσεις του. Η καθοδήγησή του ήταν σημαντική για μένα τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο, καθώς και η στήριξή του, όποτε υπήρξε η ανάγκη. Επίσης, είναι ο άνθρωπος που με ενέπνευσε να ασχοληθώ με την έρευνα καθώς ένα από τα μεγαλύτερα μαθήματα που πήρα στο πλευρό του ήταν αυτό που τα παρακάτω λόγια περιγράφουν απόλυτα *«η επιστημονική ανακάλυψη συνίσταται στο να βλέπεις αυτό που βλέπει ο καθένας και να σκέφτεσαι αυτό που δε σκέφτεται κανένας»* (Albert von Szent-Gyorgyi, Φυσιολόγος). Για όλα τα παραπάνω τον ξεχώρισα και πραγματικά τον ευγνωμονώ.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω θερμά την Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Ανδριάνα Καλιώρα, καθώς οι χρήσιμες επιστημονικές της συμβουλές και οι γνώσεις συνέβαλαν στην επιτυχή περάτωση της μελέτης Την ευχαριστώ επίσης για τη στάση της, στα χρόνια της συνεργασίας μας. Τα λόγια της μου έδιναν πάντα τη θέληση να βελτιώνομαι και να πετυχαίνω τους στόχους μου, ενώ η υπομονή της και η φιλική της στάση μου έδιναν κουράγιο να ξεπεράσω τις δυσκολίες που συναντούσα.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ομότιμο Καθηγητή κ. Μόσχο Πολυσίου για τις χρήσιμες υποδείξεις και επιστημονικές προτάσεις και επισημάνσεις καθ’ όλη τη διάρκεια εκπόνησης της μελέτης όσο και επί της συγγραφής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Ερευνητή Α’, Δρ Δημήτρη Κλέτσα, Διευθυντή του Εργαστηρίου Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», που με φιλοξένησε στο εργαστήριό του. Πολλά θερμά ευχαριστώ αξίζει επίσης ο Ερευνητής Γ’, Δρ Χάρης Πρατσίνης, μέλος του εργαστηρίου Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης, για τη συνεισφορά του στη διεξαγωγή των πειραμάτων της κυτταρομετρίας ροής, για τις πολύτιμες επιστημονικές συμβουλές του και για τις εύστοχες παρατηρήσεις. Η συμβολή του στην ολοκλήρωση της μελέτης ήταν πραγματικά μεγάλη και για μένα, ήταν μεγάλη τιμή και χαρά που συνεργάστηκα στενά μαζί του.

Για τη μεγάλη τιμή και τις παρατηρήσεις επί του κειμένου και της υποστήριξης, ευχαριστώ και τα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής κ. Γιώργο Δεδούση, Καθηγητή, κ. Λέανδρο Σκαλτσούνη. Καθηγητή και κ Παναγιώτη Ζουμπουλάκη, Ερευνητής Γ'.

Δε θα έπρεπε να παραλείψω να ευχαριστώ τον αείμνηστο Δρ Παναγιώτη Κεφάλα από το Μεσογειακό Αγρονομικό Ινστιτούτο Χανίων (ΜΑΙΧ) για την ανάλυση των συστατικών των αφεψημάτων με LC-DAD-MS και για τις παρατηρήσεις του επί των αποτελεσμάτων. Η βοήθειά του ήταν ανεκτίμητη. Επίσης, ευχαριστώ τους Δρ Αικατερίνη Σακελλάρη και Δρ Σωτήρη Καραβόλτσο από το Εργαστήριο Χημείας Περιβάλλοντος του ΕΚΠΑ, για τη φιλοξενία στο χώρο του εργαστηρίου τους, για τις γνώσεις τους που μοιράστηκαν μαζί μου σε τεχνικές αναλυτικής Χημείας και τη συμβολή τους στη συγγραφή της δημοσίευσης.

Για τη φιλική τους στάση καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης ευχαριστώ τους κυρίους Π. Κανέλλο και Π. Ηγουμενίδη, τις κυρίες Μ. Χρηστέα, Α. Γκιοξάρη, Α. Κατσαρού, Ε. Νικολιδάκη και Ε. Παναγοπούλου καθώς και υπόλοιπα μέλη του Εργαστήριου Χημείας-Φυσικοχημείας-Βιοχημείας Τροφίμων.

Θερμά ευχαριστώ επίσης αξίζουν στη Διαιτολόγο, Χαρά Κουνδουράκη, την οποία γνώρισα αρχικά ως φοιτήτρια του τμήματος. Τα πέντε τελευταία χρόνια ήταν πάντα δίπλα μου δίνοντας μου αμέριστη συμπαράσταση, υποστήριξη και βοήθεια τόσο σε προσωπικό όσο και επιστημονικό επίπεδο. Την ευγνωμονώ για όσα μου έχει προσφέρει ως επιστήμων και ως φίλη, νιώθω πραγματικά τυχερή που τη γνώρισα.

Ολοκληρώνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους δικούς μου ανθρώπους. Το σύντροφό μου, Νίκο, για την απεριόριστη κατανόηση, στήριξη και αγάπη που μου δείχνει, την αδερφή μου, Πένυ, που είναι πάντα δίπλα μου στηρίζοντας τις επιλογές μου και τη μητέρα μου, Άννα, για την αγάπη της, τη στήριξή της και την αγωνία που περνά μαζί μου όλα αυτά τα χρόνια. Χωρίς αυτούς δε θα τα είχα καταφέρει και είμαι σίγουρη ότι χαίρονται όσο και εγώ για την επιτυχία ολοκλήρωσης της διδακτορικής μου διατριβής.

Στη μητέρα μου, Άννα

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη ..... - 1 -

Abstract ..... - 3 -

Συντμήσεις ..... - 7 -

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι : ΕΙΣΑΓΩΓΗ ..... - 8 -

1.1 Γενικά Στοιχεία ..... - 11 -

1.1.1 Διατροφή και Υγεία ..... - 11 -

1.1.2 Μεσογειακή Διατροφή ..... - 12 -

1.2 Βότανα και Φαρμακευτικά Φυτά ..... - 14 -

1.2.1 Ορισμοί ..... - 14 -

1.2.2 Μεσογειακά Βότανα ..... - 14 -

1.2.3 Χρήσεις Βοτάνων- Φαρμακευτικών και Αρωματικών Φυτών ..... - 16 -

1.2.4 Παραδοσιακή Ιατρική ..... - 18 -

1.3 Φυτοχημικά που Περιέχονται στα Βότανα ..... - 19 -

1.3.1 Γενικά Στοιχεία ..... - 19 -

1.3.2 Μέθοδοι Εκχύλισης Φυτοχημικών ..... - 20 -

1.4 Πολυφαινολικά Συστατικά ..... - 21 -

1.4.1 Γενικά Στοιχεία-Κατηγορίες ..... - 21 -

1.4.2 Προσδιορισμός Πολυφαινολών ..... - 23 -

1.5 Τερπένια ..... - 24 -

1.5.1 Γενικά Στοιχεία- Κατηγορίες ..... - 24 -

1.5.2 Προσδιορισμός Τερπενίων ..... - 25 -

1.6 Αντιοξειδωτική Δράση Φυτοχημικών/ Βοτάνων ..... - 26 -

1.6.1 Γενικά Στοιχεία ..... - 26 -

1.6.2 Προσδιορισμός Αντιοξειδωτικής Δράσης ..... - 27 -

1.6.3 Αντιοξειδωτική Δράση Συστατικών Βοτάνων In Vitro ..... - 27 -

1.6.4 Αντιοξειδωτικά Συστατικά των Βοτάνων στην Αθηροσκλήρωση ..... - 29 -

1.7 Αντιφλεγμονώδης Δράση Φυτοχημικών των Βοτάνων στην Αθηροσκλήρωση ..... - 32 -

1.8 Χημειοπροστατευτική Δράση Φυτοχημικών/ Βοτάνων ..... - 34 -

1.8.1 Γενικά Στοιχεία ..... - 34 -

1.8.2 Αναστολή του Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού ..... - 35 -

1.8.3 Αναστολή της Εξέλιξης του Κυτταρικού Κύκλου ..... - 36 -

1.8.4 Επαγωγή της Απόπτωσης ..... - 38 -

1.8.5 Αντιφλεγμονώδης Δράση ..... - 42 -

1.8.5.1 Πυρηνικός Παράγοντας- kappa B (NF-κB) ..... - 42 -

1.8.5.2 Ενεργοποιούσα Πρωτεΐνη-1 ..... - 42 -

1.8.5.3 Κυκλοξυγονάση (COX) ..... - 43 -

1.8.5.4 Κυτταροκίνες και Χημειοκίνες ..... - 44 -

1.8.5.5 Μηχανισμοί Δράσεις των Φυτοχημικών ..... - 44 -

1.9 Επιδημιολογικές Μελέτες ..... - 45 -

1.10 Σκοπός ..... - 47 -

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ..... - 49 -

2.1 Αρωματικά Φυτά (Παραλαβή και Αποθήκευση) ..... - 51 -

2.2 Παρασκευή Αφεψημάτων ..... - 51 -

2.3 Παραλαβή Αφυδατωμένου Αφεψήματος ..... - 52 -

2.4 Ποιοτικός και Ποσοτικός Προσδιορισμός Δευτερογενών Μεταβολιτών των Αρωματικών Φυτών στα Αφεψήματα ..... - 53 -

2.4.1 Προσδιορισμός Συνολικού Φαινολικού Περιεχομένου με τη Μέθοδο Folin- Ciocalteu ..... - 53 -

2.4.2 Προσδιορισμός Ολικών Φλαβανολών ..... - 55 -

2.4.3 Ποιοτικός και Ποσοτικός Προσδιορισμός Απλών Πολυφαινολών και Τερπενικών Οξέων με Αέρια Χρωματογραφία Συζευγμένη με Φασματομετρία Μάζας (Gas Chromatography- Mass Spectrometry, GC-MS) ..... - 56 -

2.4.4 Ποιοτικός Προσδιορισμός Φαινολικών Συστατικών με τη Μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Συζευγμένης με Φασματομετρία/ Φασματοσκοπία Μάζας (Liquid Chromatography- Mass Spectrometry, LC- DAD- MS) ..... - 59 -

2.4.5 Ποιοτικός Προσδιορισμός Πτητικών Συστατικών με τη Μέθοδο GC-MS ..... - 61 -

2.5 Μελέτη της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας των Αφεψημάτων ..... - 63 -

2.5.1 Εκτίμηση της Ικανότητας Δέσμευσης Ελευθέρων Ριζών Μέσω της Δέσμευσης της 1, 1-Διφαινυλο-2- Πικρυλο-Υδραζυλο Ελεύθερης Ρίζας ($DPPH^{\bullet}$) ..... - 63 -

2.5.2 Εκτίμηση της Αναγωγικής Ικανότητας Μέσω Αναγωγής του Fe^{3+} σε Fe^{2+} (FRAP) ..... - 64 -

2.5.3 Εκτίμηση της Ικανότητας Δημιουργίας Χηλικών Συμπλόκων με Ιόντα Fe^{2+} με τη Χρήση Φεροζίνης ..... - 66 -

2.5.4 Εκτίμηση της Ικανότητα Δημιουργίας Χηλικών Συμπλόκων με Κατιόντα Cu^{+2} με τη Μέθοδο της Διαφορικής Παλμικής Ανοδικής Αναδιαλυτικής Βολταμετρίας (Differential Pulse Anodic Stripping Voltametry, DPASV) ..... - 68 -

2.5.5 Αναστολή της In Vitro Οξειδωτικής Τροποποίησης των Λιποπρωτεϊνών του Ορού από $CuSO_4$.. ..... - 71 -

2.6 Κύτταρα/ Κυτταροκαλλιέργειες ..... - 72 -

2.6.1 Κύτταρα Περιφερικού Αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs) Ανθρώπου- 72 -

2.6.1.1 Απομόνωση PBMCs ..... - 73 -

2.6.2 Καρκινικές Κυτταρικές Σειρές του Παχέος Εντέρου και του Προστάτη ..... - 74 -

2.6.2.1 Καλλιέργεια/ Ανακαλλιέργεια των Κυτταρικών Σειρών ..... - 74 -

2.6.2.2 Κατάψυξη και Απόψυξη Καρκινικών Κυττάρων ..... - 76 -

2.6.3 Μέτρηση Κυττάρων-Έλεγχος Βιωσιμότητας ..... - 78 -

2.7 Διαλυτοποίηση Στερεού Υπολείμματος Αφεψημάτων για τον Έλεγχο Βιοδραστικότητας ..... - 78 -

2.8 In vitro Μελέτη της Αντιαθηρογόνου Δράσης των Αφεψημάτων ..... - 79 -

2.8.1 Μελέτη της Τοξικότητας των Αφεψημάτων στα PBMCs Μέσω Μέτρησης των Επιπέδων της Γαλακτικής Αφυδρογονάσης (Lactate Dehydrogenase, LDH) ..... - 79 -

2.8.2 Μελέτη της Επίδρασης των Αφεψημάτων στα Επίπεδα Προφλεγμονωδών Κυτταροκινών .. - 82 -

2.9 Μελέτη της Χημειοπροστατευτικής Δράσης των Αφεψημάτων In Vitro ..... - 85 -

2.9.1 Μελέτη της Αναστολής του Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού των HT29 και PC3 από τα Αφεψήματα ..... - 85 -

2.9.1.1 Εκτίμηση του Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού με τη Μέθοδο Crystal Violet ..... - 85 -

2.9.1.2 Εκτίμηση της Μιτοχονδριακής Λειτουργίας με τη Μέθοδο MTT ..... - 87 -

2.9.1.3 Απεικόνιση της Επίδρασης των Αφεψημάτων στον Κυτταρικό Πολλαπλασιασμό των Καρκινικών Κυττάρων Ύστερα από Χρώση Κατά Giemsa ..... - 89 -

2.9.2 Μελέτη των Μηχανισμών Χημειοπροστατευτικής Δράσης των Αφεψημάτων ..... - 92 -

2.9.2.1 Μελέτη της Επίδρασης των Αφεψημάτων στα Στάδια του Κυτταρικού Κύκλου των HT29 και PC3 με τη Μέθοδο της Κυτταρομετρίας Ροής (Flow Cytometry, Fluorescence-Activated Cell Sorting, FACS) ..... - 92 -

2.9.2.2 Αξιολόγηση της Ικανότητας των Αφεψημάτων να Επάγουν την Απόπτωση σε HT29 και PC3 Κύτταρα ..... - 96 -

2.9.2.3 Μελέτη Επίδρασης των Αφεψημάτων στα Ενδοκυτταρικά Επίπεδα Οξειδωτικού Στρες σε Κύτταρα HT29 και PC3 ..... - 98 -

2.9.2.4 Αξιολόγηση της Ικανότητας των Αφεψημάτων να Αναστέλλουν τον Κυτταρικό Πολλαπλασιασμό των HT29 και PC3 Παρουσία Αντιοξειδωτικών Μορίων ..... - 104 -

2.9.2.5 Μελέτη Επίδρασης των Αφεψημάτων στα Επίπεδα των Ενδογενών Αντιοξειδωτικών Ουσιών των HT29 και Κυττάρων PC3 ..... - 104 -

2.9.2.6 Μελέτη Επίδρασης των Αφεψημάτων στα Επίπεδα Ενεργοποίησης Μεταγραφικών Παραγόντων των Κυττάρων HT29 και PC3 ..... - 109 -

2.9.3 Μελέτη Αντιφλεγμονώδους Δράσης των Αφεψημάτων ..... - 112 -

2.9.3.1 Μελέτη της Επίδρασης των Αφεψημάτων στα Επίπεδα Προφλεγμονωδών Κυτταροκινών ..... - 112 -

2.10 Στατιστική Επεξεργασία ..... - 113 -

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ..... - 115 -

3.1 Χημικές Αναλύσεις ..... - 117 -

3.1.1 Συνολικό Φαινολικό Περιεχόμενο των Αφεψημάτων ..... - 118 -

3.1.2 Προσδιορισμός Απλών Φαινολικών Συστατικών και Τερπενίων στα Αφεψήματα ..... - 119 -

3.1.3 Ταυτοποίηση Φαινολικών Συστατικών στα Αφεψήματα ..... - 123 -

3.1.4 Προσδιορισμός Πτητικών Συστατικών στα Αφεψήματα ..... - 129 -

3.2 Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής και της Αντιαθηρογόνου Δράσης των Αφεψημάτων ..... - 134 -

3.2.1 Αντιοξειδωτική δράση ..... - 134 -

3.2.1.1 Δοκιμασίες DPPH$^{\bullet}$ και FRAP ..... - 134 -

3.2.1.2 Ικανότητα Δημιουργίας Χηλικών Συμπλόκων με κατιόντα μετάλλων στοιχείων μετάπτωσης ..... - 136 -

3.2.1.3 In Vitro Οξειδωτική Τροποποίηση των Λιποπρωτεϊνών του Ορού με Ιόντα Χαλκού ..... - 137 -

3.2.2 Μελέτη της Επίδρασης των Αφεψημάτων σε Κύτταρα του Περιφερικού Αίματος (PBMCs) ..... - 140 -

3.2.2.1 Επίδραση των Αφεψημάτων στη Βιωσιμότητα των Κυττάρων ..... - 140 -

3.2.2.2 Επίδραση των Αφεψημάτων στα Επίπεδα Έκκρισης της Ιντερλευκίνης-6 (IL-6) ..... - 141 -

3.2.2.3 Επίδραση των Αφεψημάτων στα Επίπεδα Έκκρισης του Παράγοντα Νέκρωσης Όγκων (TNF-α) ..... - 144 -

3.2.2.4 Επίδραση των Αφεψημάτων στα Επίπεδα Έκκρισης της Χημειοτακτικής Πρωτεΐνης Μονοκυττάρων (MCP-1) ..... - 147 -

3.2.3 Συσχέτιση Αντιοξειδωτικής και Αντιαθηρογόνου Δράσης των Αφεψημάτων με το Φαινολικό τους Περιεχόμενο ..... - 149 -

3.3 Μελέτη Επίδρασης των Αφεψημάτων σε Καρκινική Κυτταρική Σειρά του Προστάτη (PC3) . - 149 -

3.3.1 Επίδραση των Αφεψημάτων στον Πολλαπλασιασμό των Κυττάρων ..... - 149 -

3.3.2 Επίδραση των Αφεψημάτων στη Βιωσιμότητα και στα Επίπεδα Οξειδωτικού Στρες των Κυττάρων ..... - 164 -

3.3.3 Επίδραση των Αφεψημάτων στα Επίπεδα Έκκρισης της Ιντερλευκίνης-8 (IL-8)..... - 167 -

3.3.4 Επίδραση των Αφεψημάτων στα Επίπεδα του Πυρηνικού Παράγοντα-κΒ (NF-κΒ) p65.... - 169 -

3.3.5 Συσχέτιση Χημειοπροστατευτικής Δράσης των Αφεψημάτων στα PC3 με το Φαινολικό τους Περιεχόμενο ..... - 170 -

3.4 Μελέτη Επίδρασης των Αφεψημάτων σε Καρκινική Κυτταρική Σειρά του Παχέος Εντέρου (HT29) ..... - 171 -

3.4.1 Επίδραση των Αφεψημάτων στον Πολλαπλασιασμό των Κυττάρων ..... - 171 -

3.4.2 Επίδραση των Αφεψημάτων στην Βιωσιμότητα και στα Επίπεδα Οξειδωτικού Στρες των Κυττάρων ..... - 185 -

3.4.3 Επίδραση των Αφεψημάτων στα Επίπεδα Έκκρισης της Ιντερλευκίνης-8 (IL-8)..... - 188 -

3.4.4 Επίδραση των Αφεψημάτων στα Επίπεδα του Πυρηνικού Παράγοντα-κΒ (NF-κΒ) p65.... - 190 -

3.4.5 Συσχέτιση Χημειοπροστατευτικής Δράσης των Αφεψημάτων στα HT29 με το Φαινολικό τους Περιεχόμενο ..... - 191 -

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV : ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ..... - 193 -

4.1 Συζήτηση..... - 195 -

4.2 Σύνοψη Αποτελεσμάτων..... - 212 -

4.3 Επίλογος-Προτάσεις για Περαιτέρω Έρευνα..... - 214 -

ΚΕΦΑΛΑΙΟ V : ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... - 215 -

ΚΕΦΑΛΑΙΟ VI : ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ ..... - 247 -

Παράρτημα I..... - 249 -

Παράρτημα II ..... - 253 -

Παράρτημα III ..... - 255 -

Περίληψη

Δεδομένου ότι είναι επιβεβαιωμένη η επίδραση της διατροφής στην υγεία και ότι ο επιπολασμός πολλών χρόνιων νοσημάτων αυξάνει παγκοσμίως, κρίνεται αναγκαία η ανάπτυξη διατροφικών συστάσεων που θα συμβάλουν στην επίτευξη όχι μόνο μακροζωίας, αλλά και υγιούς γήρατος. Η Μεσογειακή διατροφή, πρότυπη για τη διατήρηση της καλής υγείας, περιλαμβάνει μεταξύ άλλων στοιχείων και τα βότανα, οι ευεργετικές ιδιότητες των οποίων είναι γνωστές από την αρχαιότητα.

Στην προσπάθεια ανάδειξης φυσικών προϊόντων με βιοπροστατευτική δράση έχουν γίνει πολλές μελέτες σε βότανα και εκχυλίσματα αυτών. Από διατροφική άποψή, οι μελέτες που αφορούν στην ανάλυση των αφεψημάτων των βοτάνων είναι περιορισμένες ενώ ελάχιστες από αυτές έχουν ως αντικείμενο τα ενδημικά βότανα της Ελληνικής χλωρίδας.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο προσδιορισμός των βιοδραστικών μη-θρεπτικών μικροσυστατικών σε αφεψήματα 13 Ελληνικών βοτάνων με εφαρμογή των χρωματογραφικών τεχνικών GC-MS και LC-DAD-MS. Διερευνήθηκε επίσης η ικανότητά τους να επιδεικνύουν αντιοξειδωτική δράση και να επιδρούν σε καλλιέργειες μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος (PBMCs) υπό συνθήκες φλεγμονής και σε καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (HT29) και του προστάτη (PC3). Στα PBMCs εξετάσθηκε η επίδραση (α) στα επίπεδα έκκρισης των IL-6 και TNF-α και (β) στα επίπεδα έκκρισης της MCP-1. Στα HT29 και PC3 εξετάστηκε η επίδραση (α) στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, (β) στον κυτταρικό κύκλο, (γ) στην απόπτωση, (δ) στα επίπεδα οξειδωτικού στρες, (ε) στα επίπεδα της IL-8, και (στ) στα επίπεδα ενεργοποίησης του NF-κB.

Από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των χημικών αναλύσεων προέκυψε ότι τα αφεψήματα των βοτάνων:

- περιείχαν φαινολικά συστατικά με κυριότερους εκπροσώπους στην πλειοψηφία τους, τις τερπενοειδείς φαινόλες θυμόλη και καρβακρόλη
- περιείχαν γλυκοζυλιωμένα παράγωγα φλαβονοειδών
- παρουσίασαν ισχυρή και δοσοεξαρτώμενη αντιοξειδωτική δράση

Από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων ελέγχου της βιοδραστικότητας, τα αφεψήματα που επέδρασαν σε:

1. PBMCs:

- τροποποίησαν τα επίπεδα έκκρισης των κυτταροκινών IL-6 και TNF-α, παρουσιάζοντας κατά περιπτώσεις αντιφλεγμονώδη ή/και προφλεγμονώδη δράση
- μείωσαν τα επίπεδα της MCP-1 κατά περιπτώσεις (Μαντζουράνα, Μελισσόχορτο, Ρίγανη, Σπαθόχορτο, Φλισκούνι, Χαμομήλι)

2. HT29 και PC3:
   - μείωσαν τα επίπεδα της IL-8
   - μείωσαν τα επίπεδα του NF-κB κατά περιπτώσεις (Μελισσόχορτο, Σπαθόχορτο, Θυμάρι)
   - ανέστειλαν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, παρεμβαίνοντας σε φάσεις του κυτταρικού κύκλου
   - μείωσαν τη βιωσιμότητα των κυττάρων επάγοντας την απόπτωση
   - μείωσαν τα επίπεδα της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης

Συνολικά φάνηκε ότι η αντιοξειδωτική δράση συσχετίσθηκε ισχυρά με το φαινολικό περιεχόμενο των αφεψημάτων. Αναφορικά με την προφλεγμονώδη δράση που καταγράφηκε από την αύξηση των επιπέδων της IL-6, αυτή συσχετίσθηκε με το συριγγικό οξύ, το *p*-κουμαρικό οξύ και το σιναπικό οξύ, ενώ η αντιφλεγμονώδης δράση που εκφράστηκε ως μείωση των επιπέδων της MCP-1, αυτή συσχετίσθηκε με την παρουσία του *p*-κουμαρικού οξέος. Η εξάρτηση των καρκινικών κυττάρων από τα αντιοξειδωτικά τους συστήματα είναι επιβεβαιωμένη και μπορεί να αξιοποιηθεί για την πρόκληση του κυτταρικού θανάτου, μέσω αύξησης του οξειδωτικού στρες πάνω από το όριο τοξικότητας. Με βάση τα παραπάνω, ο υποκείμενος μηχανισμός δράσης που διερευνήθηκε ήταν η τροποποίηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης, μέσω αύξησης των ενδοκυττάριων επιπέδων των ROS και μείωσης της αντιοξειδωτικής τους άμυνας στις δύο κυτταρικές σειρές. Από τη συνολική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι, τα αφεψήματα των βοτάνων δεν επάγουν την παραγωγή δραστικών ενώσεων οξυγόνου αλλά μεταβάλουν τα επίπεδα οξειδωτικού στρες των HT29 και PC3 μέσω της μείωσης της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης (GSH).

Λέξεις Κλειδία: αφεψήματα βοτάνων, πολυφαινόλες, τερπενοειδή, GC-MS, LC-DAD-MS, αντιοξειδωτική δράση, PBMCs, FACS, καρκίνος προστάτη, καρκίνος παχέος εντέρου

Abstract

Since the role of diet in health is long-established, while on the other hand the prevalence of a plethora of chronic diseases increases worldwide, the need for development of dietary strategies that will result in longevity and healthy ageing is mounting. The Mediterranean diet, praised as the 'gold standard' in nutrition to maintain good health, includes herbs and teas, which are known for their beneficial properties since ancient times.

Aiming to identify natural products with health promoting effects, many studies have been conducted on herbs and their extracts. From a nutritional point of view, studies on the analysis of herb infusions are limited, especially as refers to endemic herbs of the Greek flora.

Thus, the aim herein was to identify the bioactive non-nutrient micro-constituents in infusions of 13 Greek herbs applying GC-MS and LC-DAD-MS analyses. Furthermore, the ability to exhibit antioxidant activities, the antiatherogenic effect on cultured peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and the antiproliferative effect and cell-death in cultured colon (HT29) and prostate (PC3) cancer cells, were investigated. Particularly in stimulated PBMCs the effect of infusions in elevated IL-6, TNF-a and MCP-1 was tested. In HT29 and PC3 cultures, inhibition in cell proliferation, influence of the cell cycle, induction of apoptosis, oxidative stress, IL-8, and activation of NF-kB were examined in presence of the infusions.

Overall, chemical analyses of the infusions showed that:

- different phenolic compounds were present, thymol and carvacrol being the main representatives in most infusions
- many glycosylated flavonoid derivatives were present in infusions
- they exhibited high and dose dependent antioxidant activity

Additionally, as refers to the bioactivity assays, the presence of infusions in:

1. stimulated PBMCs:
   - regulated pro-inflammatory IL-6, TNF-a, showing anti-inflammatory and / or pro-inflammatory effects
   - decreased MCP-1 (Marjoram, Melissa, Oregano, St. John's wort, Pennyroyal, Chamomile)
2. cultured HT29 and PC3:
   - reduced IL-8
   - downregulated NF-kB (Melissa, St. John's wort, Thyme)

- inhibited cell proliferation by interfering with the cell cycle
- decreased cell viability inducing apoptosis
- reduced intracellular GSH levels

Altogether, the antioxidant activity was strongly correlated with the phenolic content of the infusions. Regarding the pro-inflammatory activity, documented as an increase in IL-6, was associated with syringic acid, *p*-coumaric acid and sinapic acid, while the anti-inflammatory activity, expressed as a decrease in MCP-1, was correlated to *p*-coumaric acid. The dependency of cancer cells on their antioxidant systems is nowadays well-established and it represents a specific vulnerability that could be exploited to induce targeted cell death by. increasing oxidative stress above the toxicity threshold. Based on these, it was investigated whether the modification of redox homeostasis through the increment of intracellular ROS levels and the decrement of (endogenous) antioxidant defense, was the mechanism responsible for the apoptotic effect of infusions. Although no significant effect in ROS was detected, the redox homeostasis of cancer cells was altered by intracellular glutathione (GSH) depletion.

Keywords: herbal infusions; polyphenols; terpenoids; GC-MS; LC-DAD-MS; antioxidant capacity; PBMCs; FACS; prostate cancer; colon cancer

Η παρούσα διατριβή υποστηρίζεται από τις παρακάτω δημοσιεύσεις

1. **Kogiannou, D.A.A.**, Kalogeropoulos, N., Kefalas, P., Polissiou, M.G., Kaliora, A.C. (2013). Herbal infusions; their phenolic profile, antioxidant and anti-inflammatory effects in HT29 and PC3 cells. Food and Chemical Toxicology 61, 152-159

2. Kaliora, A.C., **Kogiannou, D.A.A.**, Kefalas, P., Papassideri, I.S., Kalogeropoulos, N. (2014). Phenolic profiles and antioxidant and anticarcinogenic activities of Greek herbal infusions; Balancing delight and chemoprevention? Food Chemistry 142, 233-241

3. Karavoltsos, S., Plavšić, M., Kalogeropoulos, N., **Kogiannou, D. A**., Strmečki, S., Sakellari, A., Dassenakis, M., and Scoullos, M. (2014). Copper complexing properties and physico-chemical characterisation of the organic matter in Greek herbal infusions. Food Chemistry 160, 53-60

Συντμήσεις

ABTS	2,20-azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid
AIF	apoptosis-inducing factor
AP-1	activated protein-1
Apaf-1	apoptotic protease activating factor-1
BHT	butylated hydroxytoluene
CAT	catalase
CDC6	cell division control protein 6
COX	cyclooxygenase
DMEM	dublecco's modified eagle medium
DMSO	dimethylsolfuxide
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EC_{50}	half maximal effective concentration
EGCG	epigallocatechin-3-gallate
EGFR	epidermal growth factor receptor
Endo G	endonuclease g
ERK	extracellular signal–regulated kinases
ERK	extracellular signal–regulated kinase
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FBS	fetal bovine serum
FOX	ferrous oxidation-xylenol
FTC	ferric thiocyanate
GPx	glutathione peroxidase
GSH	glutathione
GSSH	glutathione disulfide (oxidized state)
GSSG	glutathione disulfide
HDL	high density lipoprotein
IC_{50}	half maximal inhibitory concentration
ICAM-1	intracellular adhesion molecule-1
IFN-γ	interferon-gamma
IL-	interleukin-
iNOS	nitric oxide synthase
JNK	c-jun N-terminal kinase

LDL	low density lipoprotein
LPS	lipopolysaccharides
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MDA	malonaldehyde
NF- κB	nuclear factor kappa beta
NK	natural killers
oxLDL	oxidized LDL
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PG	prostaglandin
PARP	poly ADP ribose polymerase
SFE	supercritical fluid extraction
STAT	signal transducer and activator of transcription
STZ	streptozotocin
TBARS	thiobarbituric acid reactant substances
TNF-α	tumor necrosis factor-α
VCAM	vascular cell adhesion molecule

ΚΕΦΆΛΑΙΟ Ι : ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά Στοιχεία

1.1.1 Διατροφή και Υγεία

Η διατροφή αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους περιβαλλοντικούς παράγοντες που επηρεάζουν την ομοιόσταση των οργανισμών και κατ' επέκταση την ανθρώπινη υγεία. Τα τελευταία χρόνια, η εντατική έρευνα πάνω στην ανθρώπινη διατροφή βοήθησε στη μερική κατανόηση των μηχανισμών μέσω των οποίων τα τρόφιμα και τα συστατικά τους επηρεάζουν το μεταβολισμό και την υγεία. Έτσι σήμερα επικρατεί η θεώρηση ότι αιτιολογία για την εκδήλωση των περισσοτέρων ασθενειών περιλαμβάνει πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις διατροφικών και όχι μόνο παραγόντων με το γενετικό υπόβαθρο των ατόμων. Πιο αναλυτικά, ο φαινότυπος των ατόμων καθορίζεται, πέρα από το γενετικό υλικό, από διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα ήδη από τα πρώτα στάδια ανάπτυξης. Οι διαδικασίες αυτές ορίζονται ως επιγενετικές αλλαγές και αφορούν στη μεθυλίωση του γενετικού υλικού, την τροποποίηση των ιστονών, την αναδιοργάνωση της χρωματίνης ενώ η σύγχρονη βιβλιογραφία αναφέρει και την τροποποίηση της έκφρασης μη μεταφραζόμενων RNA, των microRNAs (García-Segura *et al.*, 2013; Palmer *et al.*, 2014). Αποτέλεσμα των προαναφερθέντων είναι η τροποποίηση της έκφρασης γονιδίων σε μεταγραφικό ή/και σε μετα-μεταγραφικό στάδιο με σημαντικές επιπτώσεις στο φαινότυπο (Tammen *et al.*, 2013).

Αναφορικά με τα διατροφικά πρότυπα, οι βλαβερές συνέπειες υιοθέτησης ορισμένων εξ αυτών είναι για χρόνια αντικείμενο μελέτης. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα του «Δυτικού» διατροφικού μοντέλου, που υιοθετείται κυρίως από τις αναπτυγμένες χώρες. Πιο αναλυτικά, το συγκεκριμένο πρότυπο διατροφής φαίνεται να είναι η αιτιολογία για ασθένειες, με επίκεντρο το μεταβολικό σύνδρομο, με βασικό χαρακτηριστικό τη συστηματική χρόνια μικρής έντασης φλεγμονή. Το υπερβάλλον σωματικό βάρος, η διαταραχή της ομοιόστασης της γλυκόζης, η υπέρταση και η δυσλιπιδαιμία, όλα χαρακτηριστικά του μεταβολικού συνδρόμου, σχετίζονται με τον κίνδυνο εμφάνισης σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, καρδιαγγειακών νοσημάτων (Cardiovascular diseases, CVD), ορισμένων μορφών καρκίνου, νευροεκφυλιστικών νοσημάτων (όπως η νόσος του Alzheimer), αλλά και επιπλοκών της κύησης (διαβήτης κύησης, προεκλαμψία), προβλημάτων γονιμότητας (σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών) κ.α (Ruiz-Núñez *et al.*, 2013).

Ωστόσο, παρά τις σύγχρονες ανακαλύψεις, ο επιπολασμός των διατροφικά σχετιζόμενων χρόνιων ασθενειών, ιδιαίτερα της παχυσαρκίας, του διαβήτη τύπου 2, της οστεοπόρωσης, των καρδιαγγειακών παθήσεων και των διαφόρων τύπου καρκίνου, αυξάνει δραματικά παγκοσμίως

(Collaborators, 2013; Hjartåker *et al.*, 2008; Vos *et al.*, 2012). Στην παρατήρηση αυτή συνηγορεί η αύξηση του προσδόκιμου ζωής που καταγράφεται στις αναπτυγμένες και αναπτυσσόμενες χώρες. Αξίζει να αναφερθεί ότι οι προαναφερθείσες ασθένειες είναι υπεύθυνες για το 60 % των θανάτων στις χώρες αυτές, όπου οι διατροφικές συμπεριφορές και ο γενικότερος τρόπος ζωής ενοχοποιούνται για το 40 % εξ αυτών (Niebylski *et al.*, 2015). Από τα παραπάνω συνεπάγεται η αναγκαιότητα ελέγχου του «πολλαπλασιασμού» αυτών των χρόνιων παθήσεων μέσω διατροφικών συστάσεων.

Η πρόληψη ασθενειών δια μέσου της διατροφής έχει πρωταρχικό στόχο την επίτευξη υγιούς γήρατος (healthy ageing). Αυτό σημαίνει ότι συγκεκριμένα διατροφικά πρότυπα θα συμβάλουν στην επιμήκυνση των υγιών χρόνων ζωής, γεγονός που εξασφαλίζει μεν την καλύτερη ποιότητα ζωής και τη μείωση της ταλαιπωρίας των ηλικιωμένων ομάδων του πληθυσμού, αφετέρου δε τεράστια κοινωνικοοικονομικά οφέλη (Fardet and Rock, 2014).

1.1.2 Μεσογειακή Διατροφή

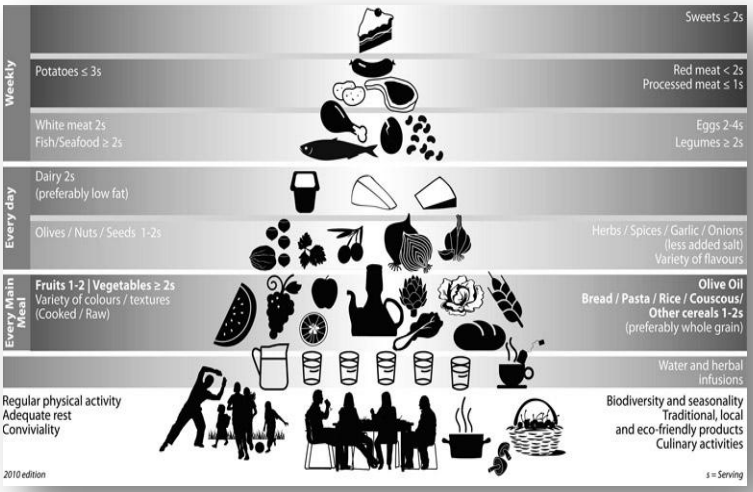
Μέχρι σήμερα έχουν προταθεί ποικίλα διατροφικά πρότυπα για τον περιορισμό του κινδύνου εμφάνισης νοσημάτων σε ένα πληθυσμό, τόσο σε πρωτοβάθμιο όσο και σε δευτεροβάθμιο επίπεδο πρόληψης. Το περισσότερο ενδιαφέρον ωστόσο συγκέντρωσε η Μεσογειακή Διατροφή (Sofi *et al.*, 2013).

Η σύλληψη και περιγραφή αυτού του διατροφικού μοντέλου χρονολογείται από την δεκαετία του 1960 όταν ο Ancel Keys και οι συνεργάτες του πραγματοποίησαν επιδημιολογική μελέτη, γνωστή και ως «Μελέτη των επτά Χωρών», τα αποτελέσματα της οποίας κατέδειξαν τις ευεργετικές ιδιότητες της διατροφής των πληθυσμών της Μεσογείου η οποία συσχετίστηκε με μειωμένα περιστατικά καρδιαγγειακών νοσημάτων και καρκίνου (Keys *et al.*, 1986). Μεταγενέστερες επιδημιολογικές μελέτες, όπως η μελέτη «Lyon Heart» (1988) (de Lorgeril *et al.*, 1999) κ.α. επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα για τα οφέλη της Μεσογειακής Διατροφής στην υγεία.

Το Μεσογειακό πρότυπο διατροφής παρουσιάζεται συνήθως με τη μορφή πυραμίδας όπου στη βάση της τοποθετούνται τα τρόφιμα εκείνα τα οποία καταναλώνονται συχνότερα δίνοντας και τη μεγαλύτερη προσλαμβανόμενη ενέργεια, ενώ στα ανώτερα επίπεδα τοποθετούνται τα τρόφιμα τα οποία πρέπει να καταναλώνονται σπανιότερα (Bach-Faig *et al.*, 2011) (Εικόνα 1.1). Παρά το γεγονός ότι δεν έχει υπάρχει κάποιος σαφής ορισμός, κύρια χαρακτηριστικά της Μεσογειακής Διατροφής αποτελούν η υψηλή κατανάλωση τροφών φυτικής

προέλευσης, όπως ελαιόλαδο και ελιές (ως κύρια πηγή λιπαρών), λαχανικά, φρούτα, όσπρια, προϊόντα ολικής αλέσεως και ξηροί καρποί, η μέτρια κατανάλωση κρασιού και η χαμηλή κατανάλωση κόκκινου κρέατος και προϊόντων κρέατος. Η υιοθέτηση του συγκεκριμένου προτύπου συνεπάγεται αυξημένη πρόσληψη υδατανθράκων (περίπου το 50 % της ενέργειας), μονοακόρεστων λιπαρών οξέων και φυτοχημικών, μέτρια κατανάλωση αλκοόλ και χαμηλή πρόσληψη κορεσμένων λιπαρών οξέων. Ταυτόχρονα με τα προαναφερθέντα, σημαντικό χαρακτηριστικό του μεσογειακού τρόπου ζωής αποτελεί η τακτική σωματική δραστηριότητα και η επαρκής ανάπαυση (Maraki and Sidossis, 2015).

Στη λεκάνη της Μεσογείου υπάρχουν διάφορες εκδοχές αυτού του μοντέλου διατροφής, ανάλογα με τις παραδόσεις, την κουλτούρα και τη βιοποικιλότητα της κάθε χώρας. Όσον αφορά την Ελλάδα, αναπόσπαστο κομμάτι της διατροφής αποτελεί η κατανάλωση βοτάνων τα οποία μάλιστα συμπεριλαμβάνονται στα συστατικά που καθιστούν τη Μεσογειακή Διατροφή πρότυπη για την προαγωγή και διατήρηση της καλής υγείας και μακροζωίας (Trichopoulou and Vasilopoulou, 2000). Το προαναφερθέν έχει άμεση σχέση με το γεγονός ότι η Ελληνική χλωρίδα είναι πλούσια σε βότανα γνωστά και ευρέως χρησιμοποιούμενα από την αρχαιότητα για τις θεραπευτικές τους ιδιότητες έναντι πολλών ασθενειών. Εύλογα λοιπόν η κατανάλωση τους υπό μορφή ροφημάτων προτείνεται σε καθημερινή βάση, όπως υποδεικνύεται από τη θέση που καταλαμβάνουν αυτά στη Μεσογειακή πυραμίδα (Εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1 Μεσογειακή Πυραμίδα (Bach-Faig *et al.*, 2011)

1.2 Βότανα και Φαρμακευτικά Φυτά

1.2.1 Ορισμοί

- Ο όρος *βότανο*, για τους βοτανολόγους, αναφέρεται αυστηρά σε μικρά ποώδη φυτά, που ενδεχομένως να φέρουν και ξυλώδη στελέχη, τα οποία παράγουν σπόρους, παύουν να δίνουν καρπούς και μαραίνονται με την ολοκλήρωση της καλλιεργητικής περιόδου. Για τους κλινικούς, ο όρος δεν αφορά μόνο σε μικρά φυλλώδη φυτά, αλλά περιλαμβάνει και φλοιούς, ρίζες, βολβούς, φύλλα, σπόρους, άνθη ή καρπούς δένδρων, θάμνων και εκχυλίσματά τους που αξιολογούνται για τις ιαματικές τους ιδιότητες, ενώ έχουν ιδιαίτερα οργανοληπτικά και αρωματικά χαρακτηριστικά (Kaliora and Kountouri, 2012).
- Ο όρος *φαρμακευτικά φυτά* αναφέρεται σε βότανα, προϊόντα βοτάνων και παρασκευάσματα βοτάνων που χρησιμοποιούνται για την πρόληψη και την αντιμετώπιση διαφόρων νοσημάτων αλλά και την ενίσχυση του ανθρώπινου οργανισμού (Srivastava *et al.*, 1996). Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO) οι θεραπευτικές τους ιδιότητες έγκεινται στην αποτελεσματική πρόληψη και θεραπεία σωματικών και ψυχικών νοσημάτων, στην ανακούφιση των συμπτωμάτων της νόσου καθώς και στην ευεργετική τροποποίηση ή ρύθμιση της σωματικής και ψυχικής κατάστασης ενός ατόμου. Οι ευεργετικές δράσεις των προαναφερθέντων τροφίμων αποδίδονται στην παρουσία ενός ή περισσοτέρων βιοδραστικών συστατικών.
- Τέλος, ο όρος *αρωματικά φυτά* αφορά είδη που χαρακτηρίζονται από την παρουσία αιθέριων ελαίων σε διάφορα μέρη του φυτού.

1.2.2 Μεσογειακά Βότανα

Η Μεσογειακή χλωρίδα γενικά αλλά και η Ελληνική ειδικότερα βρίθει αρωματικών-φαρμακευτικών φυτών και βοτάνων, ως αποτέλεσμα της γεωλογίας και της κλιματολογίας του τόπου, με αποτέλεσμα να απαντώνται στη Μεσόγειο περίπου 25000 (González-Tejero *et al.*, 2008), εκ των οποίων τα 5800 ευδοκιμούν στην Ελλάδα, με το 15.6 % εξ αυτών να είναι ενδημικά φυτά (Georghiou and Delipetrou, 2010). Παρακάτω αναφέρονται οι οικογένειες στις οποίες ανήκουν τα φυτά αυτά ενώ αναλύονται οι σπουδαιότερες οικογένειες βοτάνων που απαντώνται σε Ελληνικά ενδιαιτήματα. Στην Εικόνα 1.2 παρουσιάζονται μερικά από τα πιο γνωστά βότανα της Ελληνικής χλωρίδας.

1. *Lamiaceae*	4. *Apocyanaceae*	7. *Oleaceae*	10. *Globulariaceae*
2. *Geraniaceae*	5. *Ramnaceae*	8. *Liliaceae*	11. *Thymelaceae*
3. *Myrtaceae*	6. *Fagaceae*	9. *Ranunculariaceae*	12. *Anacardiaceae*

Οικογένεια *Lamiaceae*

Χαρακτηρίζεται από πολυάριθμα είδη ξηρών και θερμών κλιματικών περιοχών. Βασικά γνωρίσματα της οικογένεια αυτής αποτελούν: ο τετράγωνος βλαστός με τα αντιθέτως φυόμενα φύλλα, η διάταξη των ανθέων που σχηματίζουν μονοχάσια ή διχάσια, η συμπέταλη στεφάνη, ο συσσέπαλος κάλυκας που περικλείει τον σωλήνα της στεφάνης, οι τέσσερις άνισοι στήμονες που σχηματίζουν δύο ζεύγη, η επιφυής δικαρποφυλλική ωοθήκη και τα αιθέρια έλαια που παράγουν σε ειδικούς αδένες του βλαστού, των φύλλων και των ανθέων. Στην Ελλάδα φύονται πολλά είδη της οικογένειας Lamiaceae (Χειλανθή) τα οποία δεν είναι χρήσιμα μόνο ως αρωματικά αλλά και ως φαρμακευτικά, αρτυματικά, καλλωπιστικά και μελισσοτροφικά. Τα πιο κοινά είναι: Θυμάρι (*Thymus vulgaris* L.), Θρούμπι (*Satureja thymbra* L.), Φασκόμηλο (*Salvia officinalis* L.), Ρίγανη (*Origanum vulgare* L.), Δίκταμος (*Origanum dictamnus* L.), Μελισσόχορτο (*Melissa officinalis* L.), λεβάντα (*Lavandula stoechas* L.), Τσάι του βουνού (*Sideritis scardica* L.), Μέντα (*Mentha spicata* L.), Δενδρολίβανο (*Rosmarinus officinalis* L.)

Οικογένεια *Clusiaceae*

Στην οικογένεια αυτή ανήκουν περίπου 150 είδη ποωδών και θαμνωδών φυτών ή και φρύγανα. Τα δυο κυριότερα είδη της οικογένειας είναι το Σπαθόχορτο ή Βαλσαμόχορτο (*Hypericum perforatum* L.) και το Λειχηνόχορτο ή Σταρίδα (*Hypericum perfoliatum* L.).

Οικογένεια *Asteracea*

Είναι γνωστή ως οικογένεια των σύνθετων (Compositae) ή των αστεροειδών (Asteraceae) φυτών. Χαρακτηριστικό αυτής της οικογένειας είναι η σύνθετη μορφολογία των ταξιανθιών της. Τα λουλούδια τους δεν είναι πραγματικά άνθη, αλλά ψευδάνθια, δηλαδή, τροποποιημένες ταξιανθίες που ονομάζονται «κεφάλια» ή «καλαθίδια». Ο κεντρικός βλαστός της ταξιανθίας είναι συμπυκνωμένος σε μια πλακοειδή δομή, πάνω στον οποίο βρίσκονται τα ανθίδια, καθένα από τα οποία είναι μικροσκοπικά άνθη. Υπάρχουν δύο ειδών ανθίδια. Τα δισκοειδή -με πορτοκαλί-κίτρινο τμήμα του κεφαλιού της μαργαρίτας- και τα ακτινοειδή με τα λευκά πεταλοειδή στοιχεία στην περιφέρεια. Κάθε λευκή ακτίνα αποτελείται από τα συνενωμένα πέταλα ενός άνθους. Αν κοπεί με απότομη κίνηση, αφαιρείται όλο το ανθίδιο. Τέλος κάποιες μαργαρίτες μπορεί να μην έχουν καθόλου ακτινωτά ανθίδια. Τα πιο κοινά είδη της οικογένειας είναι το Χαμομήλι (*Matricaria chamomilla* L.) και η Μαργαρίτα (*Bellis perennis* L.).

Εικόνα 1.2 Α. *Lavandula stoechas* L., Β. *Sideritis syriaca* L., Γ *Rosmarinus officinalis* L., Δ *Mentha spicata* L., Ε *Salvia officinalis* L., ΣΤ *Origanum dictamnus* L., Ζ *Origanum vulgare* L., Η *Satureja thymbra* L., Θ *Thymus vulgaris* L., Ι *Mentha pulegium* L., Κ *Hypericum perforatum* L., Λ *Matricaria chamomilla* L.

1.2.3 Χρήσεις Βοτάνων- Φαρμακευτικών και Αρωματικών Φυτών

Η καλλιέργεια και η χρήση των φαρμακευτικών-αρωματικών φυτών και των βοτάνων για φαρμακευτικούς σκοπούς καταγράφονται πριν από τη γέννηση της ιατρικής. Από τη στιγμή της εμφάνισής του, ο άνθρωπος αναζήτησε «φάρμακα» στη φύση ώστε να ανακουφιστεί από ασθένειες, άλγη και τραυματισμούς (Kaliora and Kountouri, 2012; Petrovska, 2012). Εμπειρικές παρατηρήσεις και καταγραφές που σώζονται από την αρχαιότητα φανερώνουν τη χρήση των φυτών αυτών για την ενίσχυση της υγείας και της σωματικής κατάστασης του ανθρώπου. Η διαφύλαξη των γνώσεων αυτών και η χρήση των φαρμακευτικών φυτών εντάσσεται στα πλαίσια της παραδοσιακής ιατρικής (Ενότητα 1.2.4). Ορισμένες αναφορές για τη χρήση των φαρμακευτικών φυτών στην πορεία της ιστορίας παρουσιάζονται συνοπτικά παρακάτω.

Ιστορική Αναδρομή:

Η πρώτη καταγραφή των ευεργετικών ιδιοτήτων των φαρμακευτικών φυτών έγινε από τους Σουμέριους (6000 π.Χ), ενώ το 4000 π.Χ. γράφηκε το πρώτο σχετικό βιβλίο από τον Κινέζο αυτοκράτορα Shen Nung. Στη συνέχεια, αρχαίοι Έλληνες συγγραφείς όπως ο Όμηρος (800 π.Χ.)

και ο Ηρόδοτος (500 π.Χ.), αναφέρουν στα συγγράματα τους τις θεραπευτικές ιδιότητες των βοτάνων. Στα έργα του ο «πατέρας της ιατρικής», Ιπποκράτης (460-370 π.Χ.) ταξινομεί περίπου 300 είδη φαρμακευτικών φυτών αναφορικά με τη βιολογική τους δράση επισημαίνοντας σε αυτά τη φράση *"Η τροφή είναι το φάρμακό σου και το φάρμακό σου είναι η τροφή σου"*. Μεταγενέστερα, ο Θεόφραστος (371-260 π.Χ.) καθιέρωσε την επιστήμη της Βοτανολογίας και δικαίως χαρακτηρίζεται ως «πατέρας της βοτανικής» (father of botany). Σημαντικό είναι να τονιστεί ότι η διάδοση της χρήσης των φαρμακευτικών φυτών στο Δυτικό κόσμο, αναφορικά με τη διατήρηση του ευ ζην, αποδίδεται στη γνώση που εμπεριείχαν τα συγγράματα του Θεόφραστου, *"De Causis Plantarium"* (Περί φυτικών αιτιών) και *"De Historia Plantarium"* (Περί φυτών ιστορία). Στη συνέχεια, ο Διοσκουρίδης (40-90 μ.Χ.), ο «πατέρας της φαρμακολογίας», επισημαίνει στο έργο του *"De Materia Medica"* (Περί ύλης ιατρικής) πέρα από τις ευεργετικές ιδιότητες, πληροφορίες όπως μορφολογία, τόπος ανάπτυξης, τρόπος συλλογής και φαρμακευτική μορφή ενός μεγάλου αριθμού φαρμακευτικών φυτών μεταξύ των οποίων το Χαμομήλι, το Σκόρδο, το Κρεμμύδι, η Μολόχα, ο Κισσός, η Τσουκνίδα, το Φασκόμηλο κ.α.. Αναφέρεται επίσης ότι την ίδια εποχή ο Πλίνιος (23-79 μ.Χ.) συνέγραψε το έργο του *"Naturalis Historia"* (Φυσική ιστορία). Συνολικά τα έργα των δύο τελευταίων περιείχαν το σύνολο των γνώσεων για τα φαρμακευτικά φυτά έως εκείνη την εποχή. Μεταγενέστερα, πολλοί Έλληνες και Λατίνοι γιατροί και φαρμακοποιοί, όπως ο Γαληνός (129-199 μ.Χ.) υποστήριξαν τη χρήση των φαρμακευτικών φυτών αλλά και των αιθέριων ελαίων τους για θεραπευτικούς σκοπούς. Η χρήση των αιθέριων ελαίων αναφέρεται ακόμα και στη Βίβλο, ενώ περίπου τον 8^{ο} αιώνα μ.Χ. οι Άραβες βελτιστοποίησαν το τρόπο εκχύλισης τους από τα αρωματικά φυτά και παρασκεύασαν καινούργια φάρμακα και ελιξήρια. Κατά το Μεσαίωνα, οι γνώσεις για την καλλιέργεια και τις ευεργετικές ιδιότητες των φαρμακευτικών φυτών καθώς και οι μέθοδοι παρασκευής φαρμακευτικών σκευασμάτων από αυτά πέρασαν στους μοναχούς. Ανάμεσα στα βότανα που χρησιμοποιούσαν για θεραπευτικούς σκοπούς συγκαταλέγονται το Φασκόμηλο, το Γλυκάνισο, η Μέντα, η Θρύμπα κ.α.. Κατά τη διάρκεια της Αναγέννησης (14^{ος}-15^{ος} αιώνας) η χρήση βοτάνων, αιθέριων ελαίων και άλλων φυσικών προϊόντων άρχισε σταδιακά να παραμελείται, ενώ η σχεδόν πλήρης εγκατάλειψή τους είναι επακόλουθο της αλματώδους ανάπτυξης της Χημείας που οδήγησε στη δημιουργία πληθώρας συνθετικών φαρμάκων. Η χρήση τους επανέκαμψε κατά τη διάρκεια των δυο Παγκοσμίων Πολέμων λόγω των εντυπωσιακά θετικών αποτελεσμάτων που είχε η περίθαλψη τραυμάτων με παρασκευάσματα από βότανα. (Kaliora and Kountouri, 2012; Petrovska, 2012).

Ευρεία είναι επίσης η χρήση φαρμακευτικών φυτών στη θεραπεία και πρόληψη ασθενειών στα πλαίσια της ιατρικής. Η εντατική έρευνα που ξεκίνησε το 19^{ο} αιώνα, οδήγησε στην απομόνωση και ταυτοποίηση ουσιών από φυτικά/ φυσικά προϊόντα με θεραπευτικές ιδιότητες (Kaliora and Kountouri, 2012). Αν και μόνο το 20 % των φυτικών οργανισμών είχε μελετηθεί έως τις αρχές του 21^{ου} αιώνα, έχουν απομονωθεί από αυτά ουσίες οι οποίες περιέχονται σε φαρμακευτικά σκευάσματα (Cordell, 2003). Σημειώνεται ότι το ποσοστό των φαρμάκων με ουσίες φυτικής προέλευσης είναι περισσότερο από 50 % του συνόλου (Newman and Cragg, 2007), ενώ το αντίστοιχο ποσοστό ξεπερνά το 60 % για τα αντικαρκινικά φάρμακα (Gordaliza, 2007). Επιπρόσθετα, χρήση βοτάνων γίνεται και στην κοσμετολογία.

Τέλος, ως τρόφιμα τα βότανα βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στη μαγειρική τέχνη, ως ενισχυτικά γεύσης και αρώματος. Στην Ελλάδα, σε επίπεδο Δημόσιας Υγείας, το Υπουργείο Υγείας το 1999 δημοσίευσε διατροφική οδηγία σχετικά με τη χρήση βοτάνων στη μαγειρική (αποκλειστικά). Σύμφωνα με αυτή, προτείνεται η χρήση των βοτάνων στη μαγειρική υποκαθιστώντας το αλάτι αλλά και ως πηγή ωφέλιμων συστατικών. Χαρακτηριστικά αναφέρεται *"Ρίγανη, Βασιλικός, Θυμάρι και άλλα αρωματικά φυτά που καλλιεργούνται στην Ελλάδα είναι καλές πηγές αντιοξειδωτικών ενώσεων"* (Council, 1999). Αξίζει να αναφερθεί πως η Ελλάδα ίσως είναι η μόνη χώρα με ξεκάθαρες συστάσεις σχετικά με τις ευεργετικές ιδιότητες στην υγεία βοτάνων με χρήση στη μαγειρική (Tapsell *et al.*, 2006). Τέλος, τα βότανα βρίσκουν επίσης εφαρμογή στη συντήρηση και αποθήκευση ποικιλίας τροφίμων, συμβάλλοντας και στη διατήρηση των οργανοληπτικών τους ιδιοτήτων.

1.2.4 Παραδοσιακή Ιατρική

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας η παραδοσιακή ιατρική ορίζεται ως ένας κλάδος ο οποίος συμπεριλαμβάνει το συνολικό άθροισμα γνώσεων, δεξιοτήτων και πρακτικών με βάση τις θεωρίες, τις πεποιθήσεις και τις εμπειρίες ατόμων από διαφορετικούς πολιτισμούς, που μπορούν να ερμηνευτούν ή όχι και χρησιμοποιούνται για τη διατήρηση της υγείας, καθώς και για την πρόληψη, τη διάγνωση, τη βελτίωση ή τη θεραπεία σωματικών και ψυχικών νοσημάτων. Σε ορισμένες χώρες χρησιμοποιούνται επίσης και οι όροι συμπληρωματική/ εναλλακτική/ μη-συμβατική ιατρική. Στη συνέχεια αναφέρονται ορισμένα παραδείγματα Ελληνικών βοτάνων καθώς και κάποιες από τις θεραπευτικές ιδιότητες που τους αποδίδονται (Kaliora and Kountouri, 2012).

- Βασιλικός: αντισπασμωδικό, διουρητικό, κατά της δυσκοιλιότητας, βοηθητικό της μνήμης

- Δάφνη: τονωτικό, ορεκτικό
- Δενδρολίβανο: αντισηπτικό, αντιρρευματικό, τονωτικό
- Δίκταμο: εμμηναγωγό, τονωτικό, επουλωτικό
- Θυμάρι: αντισπασμωδικό, αντισηπτικό, αντιρρευματικό
- Ρίγανη: αποχρεμπτικό, αντισπασμωδικό, απολυμαντικό
- Φασκόμηλο: κατά της υπότασης, του σακχάρου και της αναιμίας
- Χαμομήλι: ηρεμιστικό, κατά της αϋπνίας, αντιγριπικό

Η εφαρμογή πρακτικών που εντάσσονται στην παραδοσιακή ιατρική κερδίζει καθημερινά έδαφος. Σημειώνεται ότι το 80 % του παγκόσμιου πληθυσμού των αναπτυσσόμενων χωρών χρησιμοποιεί φυτικά προϊόντα για λόγους υγείας (Farnsworth *et al.*, 1985), ενώ το 2012 αντίστοιχο ποσοστό ανήλθε περίπου στο 20 % για την Αμερική (Sanders *et al.*, 2016). Οι κύριοι λόγοι για τα παραπάνω είναι οι εξής:

- η πεποίθηση ότι η συμβατική ιατρική δε θα ήταν αποτελεσματική ή ότι θα είναι πιο αποτελεσματική όταν συνδυάζεται με άλλες μεθόδους (Barnes *et al.*, 2008).
- η επιθυμία για βελτίωση/ενίσχυση της υγείας προς αποφυγή μελλοντικών νοσηρών καταστάσεων (Kelly *et al.*, 2005).
- η δημιουργία αισθήματος ελέγχου επί της θεραπείας (Adams, 2007).
- το υψηλό κόστος των συμβατικών θεραπειών (Adams, 2007).
- οι αρνητικές σχέσεις με τους συμβατικούς ιατρούς σε σύγκριση με αυτούς που παρέχουν εναλλακτική ιατρική (Adams, 2007).

1.3 Φυτοχημικά που Περιέχονται στα Βότανα

1.3.1 Γενικά Στοιχεία

Οι ευεργετικές δράσεις για την υγεία, που σχετίζονται με τη χρήση βοτάνων, αποδίδονται σε ένα πλήθος χημικών ενώσεων που περιέχουν, γνωστών με τον όρο φυτοχημικά. Τα φυτοχημικά είναι δευτερογενείς μεταβολίτες φυτικών οργανισμών αλλά και μικροοργανισμών, που παράγονται σε μικρές ποσότητες και η παρουσία και το είδος αυτών ποικίλλει ανάλογα με το φυτικό ιστό. Η βιοσύνθεση τους γίνεται κυρίως από υδατάνθρακες μέσω του σικιμικού και του φαινυλοπροπενικού μονοπατιού.

Τα φυτοχημικά με βάση τη δομή και τη λειτουργία τους μπορούν να ταξινομηθούν σε πέντε κατηγορίες (Liu, 2004):

- Πολυφαινόλες
- Καροτενοειδή
- Τερπενοειδή
- Αζωτούχες ενώσεις
- Θειούχες οργανικές ενώσεις

Αναφορικά με τη φυσιολογική τους σημασία, τα φυτοχημικά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο χρωματισμό των ανθέων με αποτέλεσμα την προσέλκυση επικονιαστών ενώ όντας στυφά στη γεύση και τοξικά αποτρέπουν την κατανάλωση τους από φυτοφάγα ζώα και έντομα. Παράλληλα δρουν προστατευτικά έναντι της UV ακτινοβολίας και των παθογόνων ενώ ισχυροποιούν και το φυτοσκελετό (Barros *et al.*, 2012; Bravo, 1998; Ignat *et al.*, 2011; Naczk and Shahidi, 2006).

Διατροφικά, τα προαναφερθέντα συστατικά δεν κρίνονται απαραίτητα, επομένως η έλλειψή τους δεν προκαλεί κλινικά συμπτώματα, ωστόσο χαρακτηρίζονται υψηλής αξίας συστατικά για τη διατήρηση της υγείας και της ευημερίας στην ενήλικη ζωή ενός ατόμου αλλά και σε ηλικιωμένα άτομα. Συγκεκριμένα η διατροφική τους πρόσληψη μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο πολλών χρόνιων ασθενειών που σχετίζονται με την ηλικία, όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ο καρκίνος, η νόσος Alzheimer και ο σακχαρώδης διαβήτης (Holst and Williamson, 2008).

1.3.2 Μέθοδοι Εκχύλισης Φυτοχημικών

Η μέθοδος εκχύλισης που θα επιλεχθεί για την ανάκτηση των φυτοχημικών από τα βότανα έχει μεγάλη σημασία. Για τη μεγιστοποίηση της απόδοσης παραλαβής, θα πρέπει να ληφθούν υπόψη τόσο η φύση του φυτού όσο και οι φυσικές και χημικές ιδιότητες του συστατικού. Η χρήση διαλυτών για την παραλαβή των φυτοχημικών από βότανα είναι η πιο διαδεδομένη, κυρίως λόγω ευκολίας στη χρήση, αποτελεσματικότητας στη παραλαβή και εύρους εφαρμογής. Είναι γενικά γνωστό ότι η απόδοση της εκχύλισης με τη μέθοδο αυτή εξαρτάται από τον τύπο των διαλυτών, το χρόνο και τη θερμοκρασία εκχύλισης, την αναλογία φυτικού υλικου/ διαλύτη καθώς και από τη χημική σύνθεση και τα φυσικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων. Έως σήμερα ευρεία εφαρμογή στην εκχύλιση φυτοχημικών έχουν τόσο πολικοί όσο και μη πολικοί διαλύτες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τη χρήση νερού και διαφόρων αλκοολών ή και συνδυασμό

αυτών. Συγκεκριμένα, υδατικά διαλύματα μεθανόλης ή αιθανόλης χρησιμοποιούνται ευρύτατα για την εκχύλιση φαινολικών δομών μικρού μοριακού βάρους, ενώ για την εκχύλιση μεγαλύτερου μοριακού βάρους ουσιών, καθώς και γλυκοζυλιωμένων παραγώγων των πολυφαινολών γίνεται χρήση διαλυμάτων με αυξημένη περιεκτικότητα νερού. Εν αντιθέσει με τα προαναφερθέντα υδατοδιαλυτά μόρια, για την εκχύλιση λιπόφιλων φυτοχημικών χρησιμοποιούνται μη πολικοί διαλύτες, όπως ο διαιθυλαιθέρας (Dai and Mumper, 2010b; Tsao and Deng, 2004; Waseem and Low, 2015).

Εναλλακτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση φυτοχημικών από βότανα είναι η υποβοηθούμενη από μικροκύματα και υπερήχους εκχύλιση (microwave-assisted extraction, MAE και ultrasound-assisted extraction UAE, αντίστοιχα), η εκχύλιση με χρήση υπερκρίσιμων ρευστών (supercritical fluid extraction, SFE) και άλλες (Tsao and Deng, 2004). Οι προαναφερθείσες είναι αποτέλεσμα της ανάγκης εύρεσης μεθόδων φιλικών προς το περιβάλλον.

Από διατροφικής άποψης, το νερό, ως μέσο εκχύλισης για την πρόσληψη φυτοχημικών συστατικών από βότανα, είναι ένας απόλυτα φιλικός διαλύτης που χαρακτηρίζεται από μεγάλη πολικότητα. Η ιδιότητα του αυτή το καθιστά ικανό να εκχυλίζει μεγάλο εύρος συστατικών, έως και μη πολικών (λιπόφιλων συστατικών), όταν η εκχύλιση πραγματοποιηθεί σε υψηλή θερμοκρασία. Μειονέκτημα της χρήσης του νερού ως μέσου εκχύλισης, συγκριτικά με τις παραπάνω προαναφερθείσες μεθόδους, είναι η μικρότερη απόδοση σε φυτοχημικά.

1.4 Πολυφαινολικά Συστατικά

1.4.1 Γενικά Στοιχεία-Κατηγορίες

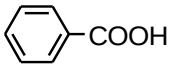
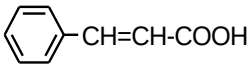
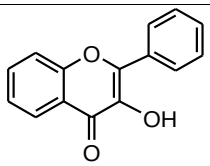
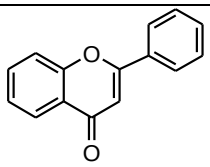
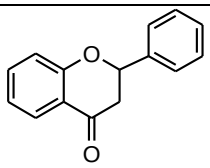
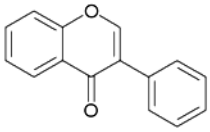
Οι διαιτητικές φαινολικές ενώσεις έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον των επιστημόνων διατροφής και τροφίμων αλλά και απλών καταναλωτών λόγω των ευεργετικών δράσεων για την υγεία. Μάλιστα, τα τελευταία χρόνια επιστημονικά ευρήματα υποστηρίζουν τον προστατευτικό τους ρόλο στην πρόληψη εκφυλιστικών ασθενειών, ιδιαίτερα του καρκίνου, της καρδιαγγειακής νόσου αλλά και νευροεκφυλιστικών νοσημάτων (Basu *et al.*, 2016; Duthie and Brown, 1994; Krga *et al.*, 2016; Milner, 1994; Mut-Salud *et al.*, 2016; Zhao, 2009).

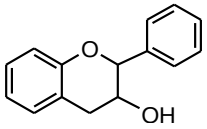
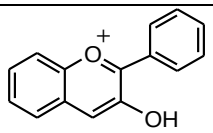
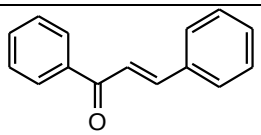
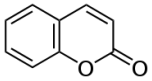
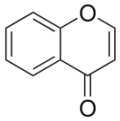
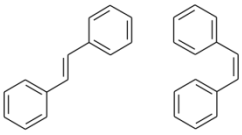
Οι διαιτητικές φαινόλες ή απλά πολυφαινόλες είναι μια πολυπληθής ομάδας φυσικών συστατικών, ευρέως διαδεδομένων στο φυτικό βασίλειο. Πιο συγκεκριμένα περισσότερες από 8000 είναι οι φαινολικές δομές που έχουν έως σήμερα απομονωθεί και προσδιοριστεί (Cheynier, 2005). Οι ενώσεις αυτές εμφανίζουν μεγάλη ποικιλία αναφορικά με την πολυπλοκότητά τους

αλλά και τη μορφή που απαντώνται στα φυτά. Αναφορικά με το τελευταίο, οι πολυφαινόλες απαντώνται συνηθέστερα σε συζευγμένη μορφή. Συγκεκριμένα, το υδροξύλιό τους μπορεί να είναι μεθυλιωμένο ή εστεροποιημένο με ένα ή περισσότερα σάκχαρα προς Ο-γλυκοζίτες ενώ τα μόρια των σακχάρων μπορεί να είναι επίσης συνδεδεμένα με ένα άτομο άνθρακα του αρωματικού τους δακτυλίου. Κύριος εκπρόσωπος των σακχάρων είναι η γλυκόζη, ενώ σπανιότερα ανευρίσκονται μόρια γαλακτόζης, ραμνόζης, ξυλόζης, αραβινόζης, καθώς και γλυκουρονικό και γαλακτουρονικό οξύ.

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, οι πολυφαινόλες παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία και για αυτό κατηγοριοποιούνται βάσει κριτηρίων όπως η προέλευση, η βιολογική δράση και η δομή τους σε τέσσερις βασικές ομάδες και υποομάδες αυτών (Tsao, 2010). Στο πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 1.1) παρουσιάζονται οι κατηγορίες των πολυφαινολών καθώς και οι κύριοι εκπρόσωποί τους ως συστατικά βοτάνων.

Πίνακας 1.1 Κατηγορίες, υποκατηγορίες και βασική δομή φαινολικών συστατικών και κυριότεροι εκπρόσωποι τους σε βότανα

Κατηγορία	Βασική δομή	Ουσία	Βότανο (Αναφορές)
Φαινολικά οξέα			
Βενζοϊκά οξέα		γαλλικό οξύ πρωτοκατεχικό οξύ συριγγικό οξύ βανιλικό οξύ	Μαντζουράνα (Roby *et al.*, 2013) Δενδρολίβανο, Θυμάρι (Vallverdú-Queralt *et al.*, 2014)
(Υδροξυ)κινναμωμικά οξέα		καφεϊκό οξύ φερουλικό οξύ *p*- κουμαρικό οξυ σιναπικό οξύ	Δενδρολίβανο, Θυμάρι, Ρίγανη, Δάφνη (Vallverdú-Queralt *et al.*, 2014)
Φλαβονοειδή			
Φλαβονόλες		καμπφερόλη κερκετίνη μυρισετίνη	Δενδρολίβανο, Θυμάρι, Ρίγανη, Δάφνη (Vallverdú-Queralt *et al.*, 2014)
Φλαβόνες		απιγενίνη λουτεολίνη	Θυμάρι, Φασκόμηλο, Μαντζουράνα (Roby *et al.*, 2013)
Φλαβανόνες		ναριγκενίνη εσπεριδίνη	Δενδρολίβανο, Θυμάρι, Ρίγανη (Roby *et al.*, 2013; Vallverdú-Queralt *et al.*, 2014)
Ισοφλαβόνες		γενιστεΐνη δαϊδζεΐνη	Κόκκινο τριφύλλι (Wang *et al.*, 2016)

Κατηγορία	Βασική δομή	Ουσία	Βότανο (Αναφορές)
Φλαβανόλες		κατεχίνη γαλλοκατεχίνη γαλλικός εστέρας της επιγαλλοκατεχίνης	Φλισκούνι, Μαντζουράνα (Taamalli *et al.*, 2015) πράσινο Τσάι (Samanidou *et al.*, 2012)
Ανθοκυανιδίνες ή συμπυκνωμένες ταννίνες		κυανιδίνη δελφινιδίνη	πράσινο και μαύρο Τσάι (Kerio *et al.*, 2012)
Χαλκόνες			
Κουμαρίνες			
Βενζο-α-πυρόνες			
Βενζο-γ-πυρόνες			
Στιλβένια			
Μονομερή στιλβένια (trans ή cis)		ρεσβερατρόλη	

1.4.2 Προσδιορισμός Πολυφαινολών

Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των πολυφαινολών βασίζεται σε ένα πλήθος τεχνικών της αναλυτική χημείας. Η ποσοτική αξιολόγηση του συνόλου των πολυφαινολών που υπάρχουν σε υδατικά και οργανικά εκχυλίσματα φυσικών προϊόντων, μπορεί να γίνει με εφαρμογή φωτομετρικών τεχνικών. Οι μέθοδοι Folin-Denis και Folin-Ciocalteu αποτελούν ευρέως διαδεδομένες φωτομετρικές τεχνικές που βασίζονται στην πραγματοποίηση οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων μεταξύ των συστατικών του δείγματος και των αντίστοιχων αντιδραστηρίων (Khoddami *et al.*, 2013) και έχουν εφαρμοστεί και στην ποσοτική αξιολόγηση των πολυφαινολών σε αφεψήματα βοτάνων, όπως το Χαμομήλι, το Δίκταμο, το Φασκόμηλο, το πράσινο και το μαύρο Τσάι κ.α. (Atoui *et al.*, 2005).

Τα περισσότερα αναλυτικά πρωτόκολλα για τον προσδιορισμό των επί μέρους φαινολικών συστατικών βασίζονται σε τεχνικές υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού (Ultraviolet-Visible, UV-Vis) ή ηλεκτροχημικό ανιχνευτή (Electrochemical, EC) (Andrade *et al.*, 1997; Calvo *et al.*,

1997; Goldberg *et al.*, 1996; Shahrzad and Bitsch, 1996; Zgórka and Glowniak, 2001). Επιπρόσθετα, ο ποιοτικός προσδιορισμός πολυφαινολών επιτυγχάνεται με μεγάλη ακρίβεια με χρήση της τεχνικής της υγρής χρωματογραφίας- φασματομετρία μάζας ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry, LC-ESI + MS). Η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόστηκε από τους Atoui και συνεργάτες (2005) σε εννιά υδατικά εκχυλίσματα Ελληνικών βοτάνων, και οδήγησε στην ταυτοποίηση πολλών φαινολικών δομών, όπως εστεροποιημένων παραγώγων φαινολικών οξέων και γλυκοζυλιωμένων δομών φλαβονοειδών (Atoui *et al.*, 2005). Ολοκληρώνοντας, για τον προσδιορισμό φαινολικών δομών ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο δείγμα, χρησιμοποιείται συνδυασμός τεχνικών φασματοσκοπίας μάζας (MS) και πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (nuclear magnetic resonance, NMR). Παράδειγμα αποτελεί ο συνδυασμός στοιχείων που προέκυψαν από φάσματα UV, MS και NMR, χρησιμοποιώντας σύστημα LC-UV-SPE-NMR-MS, με αποτέλεσμα την ταυτοποίηση των ενώσεων: ταξιφολίνη, αρωμαδενδρίνη, εριοδικτυόλη, ναριγκενίνη, και απιγενίνη (φλαβονοειδή), ροσμαρινικό οξύ (φαινολικό οξύ) και καρβακρόλη (τερπενοειδής φαινόλη), σε οργανικό εκχύλισμα Ελληνικής Ρίγανης (Exarchou *et al.*, 2003).

Η αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC) είναι μια άλλη τεχνική που εφαρμόζεται για το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση φαινολικών ενώσεων όπως φαινολικά οξέα, συμπυκνωμένες ταννίνες και φλαβονοειδή (Martin *et al.*, 2012; Proestos *et al.*, 2006; Shadkami *et al.*, 2009). Η εφαρμογή της τεχνικής της αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματοσκοπία μάζας (Mass Spectrometry, MS) είναι αρκετά διαδεδομένη τα τελευταία χρόνια, καθώς χαρακτηρίζεται από αυξημένη ευαισθησία, αν και άλλοι ανιχνευτές όπως ο ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (Flame Ionization Detector, FID) βρίσκουν εφαρμογή στην ταυτοποίηση πολυφαινολών (Khoddami *et al.*, 2013). Η εφαρμογή της τεχνικής αυτής έχει μελετηθεί σε υδατικά και μεθανολικά εκχυλίσματα βοτάνων. Πιο αναλυτικά, οι Fiamegos και συνεργάτες (2004), βελτιστοποίησαν τη μέθοδο παραγωγοποίησης για τον προσδιορισμό δώδεκα συνολικά φαινολικών συστατικών σε υδατικά εκχυλίσματα Δίκταμου, Δενδρολίβανου, Μέντας και Τεΐου (Fiamegos *et al.*, 2004).

1.5 Τερπένια

1.5.1 Γενικά Στοιχεία- Κατηγορίες

Τα τερπένια είναι υδρογονάνθρακες φυτικής προέλευσης που έχουν ως βασικό δομικό γνώρισμα έναν πενταδιενικό σκελετό, γνωστό ως ισοπρένιο ($H_2C=C(CH_3)-CH=CH_2$), που μπορεί να είναι ανοικτής αλύσου ή κυκλικός (μόνο- ή δικυκλικό). Η βιοσύνθεση τους περιλαμβάνει αρχικά τη

σύνθεση της πρόδρομης ένωσης διφωσφορικού ισοπεντενυλίου, το όποιο πολυμερίζεται προς σχηματισμό διφωσφορικού πρενυλίου. Το τελευταίο τροποποιείται από ειδικές φωσφατάσες και συνθάσες τερπενίων για το σχηματισμών του συνόλου των τερπενικών δομών. Με βάση το σύνολο των ατόμων άνθρακα, τα τερπένια κατηγοριοποιούνται στις εξής τάξεις: ημιτερπένια (C=5), μονοτερπένια (C=10), σεσκιτερπένια (C=15), διτερπένια (C=20), σεστερτερπένια (C=25), τριτερπένια (C=30), τετρατερπένια (C=40), πολυτερπένια (C > 40) (Waseem and Low, 2015). Αναφέρεται στο σημείο αυτό ότι ως τερπενοειδή ή ισοπρενοειδή ορίζονται τα τερπένια τα οποία χαρακτηρίζονται από την παρουσία οξυγόνου στη δομή τους. (Waseem and Low, 2015).

Τα τερπένια είναι λιπόφιλα μόρια, τα οποία απαντώνται στα αιθέρια έλαια των βοτάνων και στις ρητίνες άλλων φυσικών προϊόντων. Οι τερπενικές δομές που ανευρίσκονται ως συστατικά των αιθέριων ελαίων των βοτάνων είναι χαμηλού μοριακού βάρους (C=10-40), συγκεκριμένα περί το 90 % των δομών αυτών σε έλαια βοτάνων είναι μονοτερπένια. Αξίζει να αναφερθεί σε αυτό το σημείο ότι πέρα από τα τερπένια, στα αιθέρια έλαια των βοτάνων απαντώνται και άλλες κατηγορίες ενώσεων όπως: απλές αλκοόλες, αλδεΰδες, κετόνες, φαινόλες, εστέρες, αιθέρες, οξείδια, υπεροξείδια, τα φουράνια, οργανικά οξέα, λακτόνες, κουμαρίνες, και θειούχες ενώσεις (Waseem and Low, 2015).

1.5.2 Προσδιορισμός Τερπενίων

Η αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC) είναι η κύρια τεχνική που εφαρμόζεται για το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση τερπενίων σε δείγματα (κυρίως αιθέριων ελαίων). Ποικίλοι ανιχνευτές έχουν χρησιμοποιηθεί για το σκοπό αυτό, ωστόσο βέλτιστη επιλογή αποτελεί η εφαρμογή της αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματοσκοπία μάζας (Mass Spectrometry, MS). Για την ταυτοποίηση των τερπενίων σε δείγματα, οι Skoog και συνεργάτες (2002) πρότειναν τη χρήση ενός δείκτη κατακράτησης (retention index), ο οποίος προκύπτει από την ανάλυση του χρόνου κατακράτησης και του φάσματος πρότυπων ουσιών. Δεδομένου όμως ότι ο διαχωρισμός τους μεθοδολογικά μπορεί να ποικίλει (κυρίως λόγω εφαρμογής διαφορετικών θερμοκρασιακών προγραμμάτων) οι Cazes και συνεργάτες δυο χρόνια αργότερα πρότειναν τη σύγκριση του χρόνου κατακράτησης των ουσιών ενός δείγματος με ομόλογες, πρότυπες ενώσεις υδρογονανθράκων. Με αυτό τον τρόπου εισήχθη η εφαρμογή του δείκτη Kovats (Kovats index), ο οποίος βρίσκει ευρεία εφαρμογή (Waseem and Low, 2015). Στο πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 1.2) παρουσιάζονται τα κυριότερα τερπενικά συστατικά ορισμένων βοτάνων της Μεσογείου.

Πίνακας 1.2 Τερπενικά συστατικά σε βότανα

Συστατικά	Βότανο (Αναφορές)
θυμόλη, καρβακρόλη, *p*-κυμένιο, γ-τερπινένιο	Ρίγανη (Fasseas *et al.*, 2008)
ευκαλυπτόλη, καμφόρα, α-πινένιο	Φασκόμηλο (Fasseas *et al.*, 2008)
τερπεν-4-ολη, γ-τερπινένιο, α-τερπινένιο, τερπινολένιο, cis- ή trans-σαβιδένιο, καρβακρόλη	Αντωναΐδα (Aligiannis *et al.*, 2001)
καρβακρόλη, γ- τερπινένιο, π- κιμένιο	Δίκταμο (Argyropoulou *et al.*, 2014; Liolios *et al.*, 2010)
καρβακρόλη, θυμόλη, β-καρυοφυλλένιο, γ-τερπινένιο, π-κυμένιο, λιναλοόλη	Θρύμπα (Vagionas *et al.*, 2007)
α-πινένιο, β-πινένιο, β-καρυοφυλλένιο, γερανιόλη	Σπαθόχορτο (Saddiqe *et al.*, 2010)
κιτράλη, κιτρονελλάλη, γερανιόλη, λιναλοόλη, β-καριοφυλλένιο, ουρσολικό οξύ, ολεανολικό οξύ	Μελισσόχορτο (Arceusz and Wesolowski, 2013)

1.6 Αντιοξειδωτική Δράση Φυτοχημικών/ Βοτάνων

1.6.1 Γενικά Στοιχεία

Οι Halliwell και Gutteridge (1995) όρισαν ως αντιοξειδωτικό «οποιαδήποτε ουσία η οποία όταν βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση σε σχέση με το προς οξείδωση υπόστρωμα, εμποδίζει ή καθυστερεί σημαντικά την οξείδωση του υποστρώματος παρουσία ελευθέρων ριζών» (Halliwell and Gutteridge, 1995). Λίγα χρόνια αργότερα ο όρος τροποποιήθηκε ώστε να περιλαμβάνει «οποιαδήποτε ουσία καθυστερεί, εμποδίζει ή αφαιρεί την οξειδωτική βλάβη από ένα μόριο στόχος» (Halliwell, 2007a). Την ίδια χρονιά προτάθηκε ένας ακόμα ορισμός για τις αντιοξειδωτικές ουσίες από τους Khlebnikov και συνεργάτες (2007). Συγκεκριμένα αντιοξειδωτικό είναι: «οποιαδήποτε ουσία που δεσμεύει τις ελεύθερες ρίζες άμεσα ή έμμεσα τείνοντας να ρυθμίσει την αντιοξειδωτική άμυνα ή να αναστείλλει την παραγωγή των ROS» (Khlebnikov *et al.*, 2007). Για να θεωρηθεί ότι διαθέτει αντιοξειδωτική δραστικότητα ένα συστατικό, σημαντική θεωρείται η δυνατότητά, μετά τη δέσμευση της ελεύθερης ρίζας να δημιουργείται μια νέα ρίζα η οποία να σταθεροποιείται μέσω ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου ή περαιτέρω οξείδωσης (Halliwell, 1990).

Η αντιοξειδωτική δράση που επιδεικνύουν τα φυτοχημικά οφείλεται στην ικανότητα τους να:

- ✓ δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες,
- ✓ λειτουργούν ως δότες ατόμων υδρογόνου ή
- ✓ ως δότες ηλεκτρονίων,
- ✓ δημιουργούν χηλικά σύμπλοκα με μεταλλικά κατιόντα (Amarowicz *et al.*, 2004),

- ✓ αναστέλλουν τη δράση οξειδωτικών ενζύμων (Park and Pezzuto, 2002)
- ✓ επάγουν τη δράση ενδογενών αντιοξειδωτικών ενζύμων (Han *et al.*, 2007),
- ✓ προστατεύουν εξωγενή αντιοξειδωτικά.

Από τα παραπάνω, η σύγχρονη βιβλιογραφία τονίζει τη σπουδαιότητά τους να δρουν ως αντιοξειδωτικές ουσίες *in vivo* μέσω των τριών τελευταίων αναφερθέντων μηχανισμών (Forman *et al.*, 2014).

1.6.2 Προσδιορισμός Αντιοξειδωτικής Δράσης

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας φυτοχημικών και τροφίμων πραγματοποιείται με χρήση κυρίως φωτομετρικών τεχνικών. Οι μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί και βρίσκουν ευρεία εφαρμογή σχετίζονται με την εκτίμηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών που περιγράφονται στην προηγούμενη ενότητα. Ασφαλή συμπεράσματα για την αντιοξειδωτική δράση των δειγμάτων εξάγονται ύστερα από εφαρμογή τουλάχιστον δυο μεθόδων που αναφέρονται στη συνέχεια.

- ❖ Εκτίμηση της βλάβης του DNA σε συνθήκες οξειδωτικού στρες
- ❖ Εκτίμηση της βλάβης πρωτεϊνών
- ❖ Μέτρηση επιπέδων αντιοξειδωτικών ενζύμων (καταλάση, υπεροξειδική δισμουτάση), αντιοξειδωτικών μικρού μοριακού βάρους (γλουταθειόνη, ουρικό οξύ) και βιταμινών (E, C)
- ❖ Εκτίμηση της οξείδωσης λιπιδίων (συζυγή διένια, TBARS, FOX, FTC)
- ❖ Δέσμευση ελευθέρων ριζών ($O_2^{-\bullet}$, $^{\bullet}OH$, $ONOO^-$, $ABTS^{+\bullet}$, $DPPH^{\bullet}$)
- ❖ Εκτίμηση της αναγωγικής ικανότητας (FRAP)
- ❖ Ικανότητα σύμπλεξης Cu^{++} και Fe^{++}

(Amarowicz *et al.*, 2004; Antolovich *et al.*, 2000; Berker *et al.*, 2007; Gutteridge, 1995; Huang *et al.*, 2005; Moon and Shibamoto, 2009).

1.6.3 Αντιοξειδωτική Δράση Συστατικών Βοτάνων In Vitro

Η ικανότητα υδατικών εκχυλισμάτων βοτάνων να δρουν ως αντιοξειδωτικά έχει εκτιμηθεί *in vitro*. Στην πρόσφατη μελέτη των Arsenijević και συνεργατών (2016), βρέθηκε ότι υδατικά εκχύλισματα Θυμαριού (50 mg/mL) από διαφορετικές περιοχές επιδεικνύουν αντιοξειδωτική δράση η οποία εκτιμήθηκε μέσω δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας $DPPH^{\bullet}$ και της ικανότητας να ανάγουν το δισθενή σίδηρο (μέθοδος FRAP). Συγκεκριμένα, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων που προσδιορίστηκε με τη μέθοδο FRAP κυμάνθηκε μεταξύ 68.09-124.58

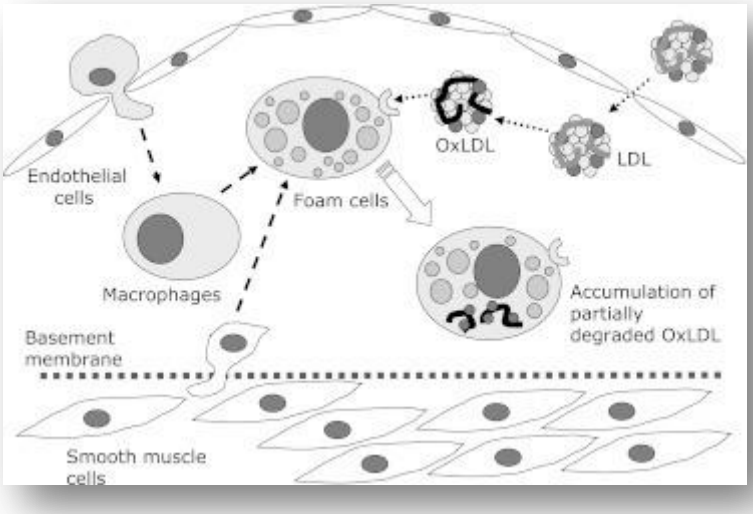
mmol Fe^{++}/L, ενώ η ικανότητά τους να δεσμεύουν κατά 50 % την ελεύθερη ρίζα $DPPH^{\bullet}$ βρέθηκε μεταξύ 1.32 και 2.96 μL/mL. Μάλιστα τα αποτελέσματα συσχετίστηκαν με την παρουσία ροσμαρινικού οξέος στο εκχύλισμα και υπολογίσθηκε ότι το 6-16 % της αναγωγικής δύναμης και το 15-53 % της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας $DPPH^{\bullet}$ οφείλεται στο συγκριμένο φαινολικό συστατικό (Arsenijević *et al.*, 2016). Οι Jiménez-Zamora και συνεργάτες (2016), προσδιόρισαν την αντιοξειδωτική δράση υδατικών εκχυλισμάτων 36 βοτάνων (13.3 mg/mL) που καταναλώνονται παραδοσιακά στην Ισπανία και ανέφεραν ότι την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση παρουσίασε το εκχύλισμα πράσινου Τεΐου, ακολουθούμενο από αυτό της Ρίγανης και του Μελισσόχορτου. Οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν στη συγκεκριμένη μελέτης ήταν η δέσμευση των ελευθέρων ριζών $ABTS^{+\bullet}$, $DPPH^{\bullet}$ καθώς και η μέθοδος FRAP και τα αποτελέσματα, για το σύνολο των βοτάνων που μελετήθηκαν, κυμάνθηκαν μεταξύ 0.11-22.89 mmol Trolox/L, 0.17-24.62 mmol Trolox/L και 0.16-24.98 mmol Trolox/L, αντίστοιχα (Jiménez-Zamora *et al.*, 2016). Η ισχυρή αντιοξειδωτική δράση του πράσινου Τεΐου επιβεβαιώνεται και από τη μελέτη των Rodrigues και συνεργατών (2016). Συγκεκριμένα, τόσο το υδατικό εκχύλισμα, όσο και το αφέψημα του βοτάνου βρέθηκαν ικανά να δεσμεύουν τη ρίζα $DPPH^{\bullet}$ ισχυρότερα από το BHT, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας (IC_{50}= 0.07 mg/mL για το εκχύλισμα, 0.06 mg/mL για το αφέψημα και 0.11 mg/mL για το BHT). Στην ίδια μελέτη, το εκχύλισμα του βοτάνου ήταν πέντε φορές πιο αποτελεσματικό από την κατεχίνη (θετικός μάρτυρας) στη δέσμευση της ρίζας $O_2^{-\bullet}$, και παράλληλα επιβεβαιώθηκε η ικανότητά του να δημιουργεί χηλικά σύμπλοκα με Cu^{++} και Fe^{++} (Rodrigues *et al.*, 2016). Μια ακόμα πρόσφατη μελέτη αξιολόγησε το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο και την αντιοξειδωτική ικανότητα υδατικών εκχυλισμάτων 230 φαρμακευτικών φυτών, τα αποτελέσματα της οποίας καταδεικνύουν τη σημασία των φαρμακευτικών βοτάνων στη μείωση του οξειδωτικού στρες, χωρίς ωστόσο να μπορεί να συσχετιστεί η δράση τους με το πολυφαινολικό τους περιεχόμενο (Li *et al.*, 2013). Το τελευταίο φάνηκε να μην επαληθεύεται στη μελέτη των Katalinic και συνεργατών, σύμφωνα με την οποία 70 φαρμακευτικά φυτά παρουσίασαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση η οποία σχετίζεται άμεσα με το φαινολικό τους περιεχόμενο (R=0.9653). Η δραστικότητα των δειγμάτων, σε μορφή υδατικών εκχυλισμάτων (15 mg/mL), παρουσίασε μεγάλες διαφορές και κυμάνθηκε μεταξύ 59-25234 (μέσος=4654) μmol Fe^{2+}/L. Ανάμεσα στα βότανα που μελετήθηκαν ήταν το Φασκόμηλο, το Μελισσόχορτο, το Δενδρολίβανο, το Θυμάρι, το Χαμομήλι και πολλά άλλα ευρέως χρησιμοποιούμενα φαρμακευτικά φυτά (Katalinic *et al.*, 2006). Αντικείμενο έρευνας έχουν αποτελέσει επίσης υδατικά εκχυλίσματα Ελληνικών βοτάνων. Συγκριμένα υδατικά εκχυλίσματα Δίκταμου, Ευκαλύπτου, Φασκόμηλου, Μέντας, Χαμομηλιού και Σιδερίτη αξιολογήθηκαν αναφορικά με την ικανότητά τους να δεσμεύουν τη ρίζα $DPPH^{\bullet}$. Για τη σύγκριση των

ευρημάτων χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης αντιοξειδωτικής αποδοτικότητας (Antiradical Efficiency, AE= $1/EC_{50}$) οι τιμές του οποίου κυμάνθηκαν μεταξύ 1.3 και 4.3 και τα βότανα κατατάχθηκαν με σειρά αυξανόμενης δραστικότητας ως εξής: Χαμομήλι< Τσάι βουνού< Μέντα< Φασκόμηλο< Ευκάλυπτος< Δίκταμο (Atoui *et al.*, 2005).

1.6.4 Αντιοξειδωτικά Συστατικά των Βοτάνων στην Αθηροσκλήρωση

Η αθηροσκλήρωση αποτελεί ένα χρόνια εξελισσόμενο νόσημα, τα συμπτώματα της οποίας εμφανίζονται συνήθως κατά τη μέση ηλικία ή αργότερα. Η βασική μορφολογική αλλοίωση που παρατηρείται είναι ο σχηματισμός, στον έσω χιτώνα της αρτηρίας, της αθηρωματικής πλάκας. Η τελευταία αποτελείται κυρίως από λιπίδια, με κυριότερο εκπρόσωπο τη χοληστερόλη (και εστέρες αυτής) σε μορφή πρωτεϊνικού συμπλέγματος. Για την εκδήλωση της νόσου απαραίτητη είναι η συμμετοχή κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (μονοκύτταρα, μακροφάγα, Τ-λεμφοκύτταρα), ενδοθηλιακών και λείων μυϊκών κυττάρων, αιμοπεταλίων, καθώς και ενός πλήθους παραγόντων όπως: λιποπρωτεΐνες, oxLDL, μόρια προσκόλλησης, αυξητικοί παράγοντες, κυτταροκίνες, χημειοκίνες κ.α.

Η LDL είναι βασικό μόριο για την εξέλιξη της νόσου. Ο φυσιολογικός βιολογικός ρόλους του μορίου αφορά στη μεταφορά χοληστερόλης στους ιστούς. Ωστόσο σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, η αλληλεπίδραση του μορίου της LDL με ελεύθερες ρίζες οδηγεί σε μετατροπή της στο οξειδωμένο παράγωγό της, oxLDL. Τα γεγονότα που διαδραματίζονται στη συνέχεια, απεικονίζονται στην Εικόνα 1.3, και εν ολίγοις περιλαμβάνουν τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος (PBMC) σε μακροφάγα τα οποία χαρακτηρίζονται από έκκριση πρωτεϊνασών, οι οποίες προκαλούν βλάβη σε ενδοθηλιακά κύτταρα αλλά και περαιτέρω οξείδωση της LDL. Επιπρόσθετα διεγείρεται ο πολλαπλασιασμός, η μετανάστευση προς τον έσω χιτώνα και η αύξηση της διαπερατότητας για τις λιποπρωτεΐνες των λείων μυϊκών κυττάρων, με αποτέλεσμα τα τελευταία να μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα. (Steinberg et al, 1989). Παράλληλα, σε αφρώδη κύτταρα μετατρέπονται και τα μακροφάγα, τα οποία σχηματίζουν μια λιπώδη γράμμωση κατά μήκος της αρχικά εντοπισμένης ενδοθηλιακής βλάβης (Abd El-Hady and El-Shahid, 2014; Aviram and Fuhrman, 2002).



Εικόνα 1.3 Ο ρόλος της oxLDL στο σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας (Itabe, 2012)

Η ικανότητα βοτάνων να αναστέλλουν την οξείδωση της LDL έχει μελετηθεί. Συγκεκριμένα, μια πρόσφατη μελέτη κατέδειξε την ικανότητα του αιθανολικού εκχυλίσματος από Βασιλικό και Θυμάρι να αναστέλλει *in vitro* την οξείδωση της LDL παρουσία χαλκού. Η αντιοξειδωτική δράση των προαναφερθέντων επιβεβαιώνεται και με την εφαρμογή της μεθόδου TBARS (Abd El-Hady and El-Shahid, 2014). Καρδιοπροστατευτική δράση με παρόμοιο μηχανισμό παρουσιάζει και το Δενδρολίβανο. Σύμφωνα με τη μελέτη των Jin και Cho, το υδατικό εκχύλισμα Δενδρολίβανου (100 mg/mL) έχει την ικανότητα να αναστέλλει την παραγωγή συζυγών διενίων, προϊόντων οξείδωσης της LDL (Jin and Cho, 2011). Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνονται στη μελέτη των Cazzola και συνεργατών, οι οποίοι κατέδειξαν την αντιοξειδωτική δράση μεθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων Δενδρολίβανου, πλούσιων σε φαινολικά συστατικά (Cazzola *et al.*, 2011). Η αντιοξειδωτική δράση του Δενδρολίβανου φαίνεται να αποδίδεται στην παρουσία ροσμαρινικού και καρνοσολικού οξέος στα εκχυλίσματά του (Pearson *et al.*, 1997; Zeng *et al.*, 2001). Η δράση επιβεβαιώνεται και για άλλα συστατικά βοτάνων τα οποία ανήκουν στα φλαβονοειδή, όπως η μυρισετίνη, η καμπφερόλη και τα μονοτερπένια θυμόλη και καρβακρόλη (Ha *et al.*, 2014; Kulisic *et al.*, 2007; Lian *et al.*, 2008; Prieto *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2008).

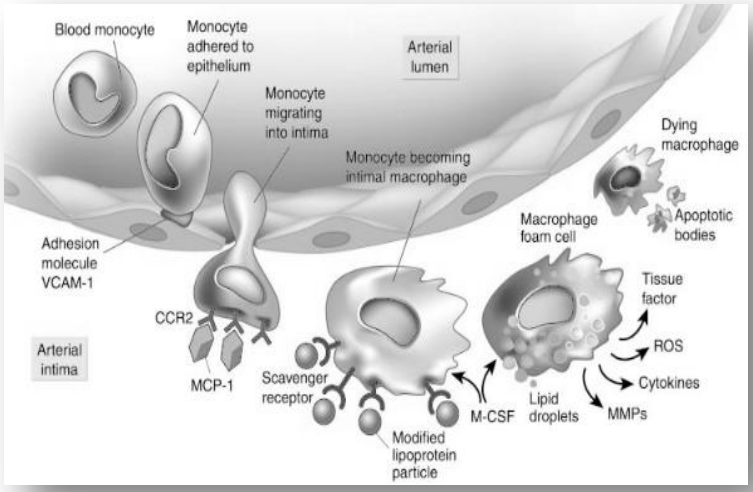
Η αντιοξειδωτική δράση βοτάνων και συστατικών τους έχει διερευνηθεί και με *ex vivo* μελέτες. Συγκεκριμένα, οι Percival και συνεργάτες πραγματοποίησαν μελέτη διατροφικής παρέμβασης για την αξιόλογηση της καρδιοπροστατευτικής δράσης δεκατριών αρωματικών φυτών και μπαχαρικών, μεταξύ των οποίων η Ρίγανη, το Φασκόμηλο και το Δενδρολίβανο. Τα δείγματα καναλώνονταν σε καθημερινή βάση επί 7 ημέρες υπό μορφή κάψουλας. Μετά από την ολοκλήρωση της παρέμβασης, απομονώθηκαν ορός και PBMCs από το αίμα των εθελοντών (10/

ομάδα). Από την αξιολόγηση των αποτελεμάτων προέκυψε ότι, στο σύνολό τους τα βότανα βελτιώνουν την οξειδωτική κατάσταση του ορού. Παράλληλα, το Φασκόμηλο και το Δενδρολίβανο φάνηκαν ικανά να αναστέλλουν την επαγόμενη από υπεροξείδιο του υδρογόνου απόπτωση των PBMCs (Percival *et al.*, 2012). Θετικά είναι και τα ευρήματα μελετών αναφορικά με την αντιαθηρογόνο δράση φαινολικών συστατικών σε ζωικά μοντέλα που σχετίζεται με την αντίσταση στην επαγόμενη οξείδωση της LDL ή/και του συνόλου των λιπιδίων του πλάσματος (Kurosawa *et al.*, 2005; Yamakoshi *et al.*, 1999).

Τέλος, η καρδιοπροστατευτική δράση βοτάνων και συστατικών τους έχει μελετηθεί και με *in vivo* δοκιμές. Συγκεκριμένα, η χορήγηση υδατικού εκχυλίσματος Δενδρολίβανου σε αρσενικούς επίμυες τύπου Wistar (μετά από STZ- επαγόμενο διαβήτη) για 30 ημέρες σε συγκεντρώσεις 25, 50 και 100 mg/kg, προκάλεσε αύξηση των ηπατικών επιπέδων των αντιοξειδωτικών ενζύμων GPx και CAT και της SOD στον εγκέφαλο (Silva *et al.*, 2011). Μέρος της δράσης του Δενδρολίβανου πιθανώς οφείλεται στην παρουσία του ροσμαρινικού οξέος. Το τελευταίο επιβεβαιώθηκε ύστερα από εκ του στόματος χορήγηση 10 mg/kg ροσμαρινικού οξέος σε αρσενικούς ποντικούς τύπου Wistar, οι οποίοι λάμβαναν διατροφή φρουκτόζης, για 45 ημέρες. Η παρέμβαση οδήγησε σε βελτίωση της οξειδωτικής κατάστασης του πλάσματος και του καρδιακού ιστού, ενώ η αντιοξειδωτική δράση του ροσμαρινικού οξέος επιβεβαιώθηκε λόγω της αύξησης που σημειώθηκε, στα ίδια δείγματα, στα επίπεδα των αντιοξειδωτικών ενζύμων CAT, SOD και GPx και στο λόγο GSH/GSSG (Karthik *et al.*, 2011).

1.7 Αντιφλεγμονώδης Δράση Φυτοχημικών των Βοτάνων στην Αθηροσκλήρωση

Για την έναρξη της φλεγμονώδους διαδικασία απαραίτητη κρίνεται η μετανάστευση στο ενδοθήλιο κυττάρων του αίματος, που σχετίζονται με την άμυνα, στις περιοχές που έχουν υποστεί βλάβη. Στην αθηρωματική διαδικασία, μόριο κλειδί για τη μετακίνηση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο, αποτελεί ο VCAM. Το μόριο αυτό εκφράζεται από ενδοθηλιακά κύτταρα ήδη μετά την έναρξη μιας αθηρωματικής δίαιτας, πιθανώς ως αποτέλεσμα της φλεγμονής που υποκινείται από τροποποιημένα σωματίδια λιποπρωτεϊνών, τα οποία και συσσωρεύονται στον αρτηριακό χιτώνα σε απόκριση της υπερλιπιδαιμίας. Η οξειδωτική διαδικασία που λαμβάνει χώρα στο σημείο επάγει περαιτέρω την έκφραση του VCAM από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, εν μέρει μέσω της ενεργοποίησης του NF-κB. Επιπρόσθετα έχει βρεθεί ότι μόρια προφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως ο TNF-α, η IL-6 και η IL-1β, που παράγονται στην περιοχή της φλεγμονής προάγουν την έκφραση του VCAM, ενδεχομένως μέσω του ίδιου μονοπατιού. Η διαδικασία της φλεγμονής στο σημείο ενισχύεται με την παραγωγή μορίων που προάγουν το χημειοτακτισμό των λευκοκυττάρων (Εικόνα 1.4). Στην προαναφερθείσα διαδικασία επιβεβαιωμένος είναι ο ρόλος των χημειοκίνων MCP-1 και IL-8, ερμηνεύοντας την επιλογή τους ως σημαντικά μόρια «στόχος» στη προληπτική και θεραπευτική προσέγγιση της νόσου (Libby, 2012).



Εικόνα 1.4 Παρουσίαση του μηχανισμού στρατολόγησης των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο, ως απόκριση στη φλεγμονή και ο ρόλος των κυττάρων στην ενίσχυση του φαινομένου (Libby, 2012)

Ένα σύνολο μελετών επιβεβαιώνουν την ικανότητα πολλών φυτοχημικών συστατικών των βοτάνων, να παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη δράση, η οποία σχετίζεται με αναστολή της έκκρισης και έκφρασης προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Στις περισσότερες περιπτώσεις

μάλιστα, ο πιθανός μηχανισμός, μέσω του οποίου παρουσιάζουν την προαναφερθείσα δράση, σχετίζεται με την αναστολή της ενεργοποίησης μεταγραφικών παραγόντων (NF-κB και AP-1) αλλά και την αναστολή της δραστικότητας προφλεγμονωδών ενζύμων, όπως η COX-2 (Maroon *et al.,* 2010). Πιο αναλυτικά, στην μελέτη των Comalada και συνεργατών παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων έκκρισης του TNF-α σε διεγερμένα με LPS μακροφάγα ύστερα από επώαση με τα φλαβονοειδή λουτεολίνη, κερκετίνη, γενιστεΐνη, καμπφερόλη, απιγενίνη, διοσμετίνη και εσπερετίνη σε συγκεντρώσεις 25 και 50 μM. Μάλιστα παρατηρήθηκε σχέση δομής-δράσης, με τις λουτεολίνη, κερκετίνη και γενιστεΐνη να είναι οι πλέον αποτελεσματικοί αναστολείς του TNF-α. Παράλληλα, η κερκετίνη και η λουτεολίνη διέγειραν την έκφραση της αντιφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-10, σε χαμηλές συγκεντρώσεις (< 50 μM) (Comalada *et al.,* 2006). Η *in vitro* αναστολή της έκκρισης των IL-6 και TNF-α από τη λουτεολίνη (3-10 μM) σε ανθρώπινα μονοκύτταρα, σε συνθήκες υπεργλυκαιμίας, μέσω της αναστολής ενεργοποίησης του NF-κB, επιβεβαιώνεται σε μια ακόμα μελέτη (Kim *et al.,* 2014). Η αντιφλεγμονώδης δράση της κερκετίνης και λουτεολίνης, σε συγκέντρωση 25 μM, σημειώνεται και σε διεγερμένα με LPS ανθρώπινα κύτταρα αίματος. Συγκεκριμένα, φάνηκε να προκαλούν σημαντική μείωση στην έκφραση των κυτταροκινών IL-1β, IFN-γ, IL-6 και TNF-α ύστερα από 24 h επώασης (Ribeiro *et al.,* 2015a). Η δράση της κερκετίνης στην αθηρωματική διαδικασία έχει επιβεβαιωθεί και σε μια *in vivo* δοκιμή. Συγκεκριμένα, διατροφική παρέμβαση με κερκετίνη (150 mg) για 6 εβδομάδες σε παχύσαρκα άτομα οδήγησε σε μείωση της κυτταροκίνης TNF-α στον ορό (Egert *et al.,* 2009). Στη μελέτη των Hsu και συνεργατών, ένα ακόμα συστατικό βοτάνων, η ναριγκενίνη (10-50 μM) προκάλεσε σημαντική μείωση στα επίπεδα έκκρισης των NO, MCP-1 και TNF-α σε ενεργοποιημένα με LPS RAW 264.7 μακροφάγα (Hsu *et al.,* 2013). Στην ίδια μελέτη, η ναριγκενίνη (10-25 μM) ανέστειλε επίσης την LPS επαγόμενη έκφραση των πρωτεϊνών iNOS, COX-2, και pERK.

Παράλληλα με τα συστατικά τους, τα τελευταία χρόνια αντικείμενο έρευνας έχει γίνει η επίδραση εκχυλισμάτων βοτάνων στην φλεγμονώδη απόκριση *in vitro*. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι εκχυλίσματα Βασιλικού και Μαντζουράνας (με τη μέθοδο SFE) αναστέλλουν σημαντικά την έκκριση των IL-1β, IL-10, IL-6 και TNF-α σε διεγερμένα με LPS και oxLDL THP-1 μακροφάγα. Η αντιφλεγμονώδης δράση που παρουσιάζουν στη συγκέντρωση που μελετήθηκε (10 μg/mL) αποδόθηκε στην αναστολή της έκφρασης των γονιδίων COX-2 και NF-κB, στο επίπεδο της μεταγραφής (Arranz *et al.,* 2015). Το εκχύλισμα πτητικών συστατικών Ρίγανης έχει επίσης μελετηθεί. Πιο αναλυτικά, οι Ocaña-Fuentes και συνεργάτες, επιβεβαίωσαν την ικανότητα του εκχυλίσματος ρίγανης να αναστέλλει τόσο την έκκριση όσο και την έκφραση

των κυτταροκινών IL-1β, IL-10, IL-6 και TNF-α σε διεγερμένα με oxLDL THP-1 μακροφάγα (Ocaña-Fuentes *et al.*, 2010). Επιπρόσθετα, οι Mueller και συνεργάτες διερεύνησαν την αντιφλεγμονώδη δράση οργανικών εκχυλισμάτων Ρίγανης, Βασιλικού, Φασκόμηλου, Θυμαριού, Μαντζουράνας, Δενδρολίβανου και Δάφνης σε *in vitro* μοντέλο φλεγμονής. Τα ευρήματα της μελέτης καταδεικνύουν την ικανότητα των εκχυλισμάτων των βοτάνων (0.5 mg/mL) να αναστέλλουν κατά 25 % την έκκριση των IL-6 και TNF-α, σε διεγερμένα με LPS RAW 264.7 μακροφάγα (Mueller *et al.*, 2010). Στην ίδια μελέτη βρέθηκε ότι τα βότανα είναι ικανά να επάγουν την έκκριση της IL-10 και να αναστέλλουν την έκφραση των πρωτεϊνών iNOS, COX-2. Τέλος, η αντιφλεγμονώδης δράση των βοτάνων επιβεβαιώνεται στη μελέτη των Percival και συνεργατών, στην οποία η επώαση ανθρώπινων μακροφάγων, ύστερα από *in vitro* μετατροπή τους σε αφρώδη κύτταρα, με ορό εθελοντών που συμμετείχαν σε διατροφική παρέμβαση, προκάλεσε μείωση των επιπέδων έκφρασης του TNF-α. Τα βότανα που αξιολόγήθηκαν ήταν η Ρίγανη, το Φασκόμηλο και το Δενδρολίβανο και καναλώνονταν σε καθημερινή βάση για 7 ημέρες σε μορφή κάψουλας (Percival *et al.*, 2012).

1.8 Χημειοπροστατευτική Δράση Φυτοχημικών/ Βοτάνων

1.8.1 Γενικά Στοιχεία

Ο όρος «χημειοπροφύλαξη ή χημειοπροστασία» επινοήθηκε στα μέσα της δεκαετίας το ’70, με σκοπό να περιγράψει τη χρήση φυσικών, συνθετικών ή βιολογικών παραγόντων για την πρόληψη, τη διακοπή/αναστολή ή την αντιστροφή των κυτταρικών και μοριακών διαδικασιών της καρκινογένεσης (Sporn, 1976; Steward and Brown, 2013). Σήμερα, ο όρος χημειοπροφύλαξη ενσωματώνει την έννοια της «καθυστέρησης», πράγμα που σημαίνει ότι η προληπτική δράση μπορεί να διαρκέσει για ένα πεπερασμένο χρονικό διάστημα. Ο ρυθμός ανάπτυξης του όγκου κατ’ επέκταση μειώνεται, με αποτέλεσμα την αύξηση του προσδόκιμου ζωής (Lippman and Hong, 2002; Steward and Brown, 2013). Ανάλογα με το στάδιο κατά το οποίο λαμβάνονται οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες, τρεις προσεγγίσεις έχουν περιγραφεί. Η «πρωτοβάθμια χημειοπροφύλαξη» περιλαμβάνει τη χορήγηση των παραγόντων σε υγιή άτομα ή σε άτομα που δεν έχουν ακόμα εκδηλώσει τη συμπτωματολογία, αλλά χαρακτηρίζονται ως υψηλού κινδύνου. Η «δευτεροβάθμια χημειοπροφύλαξη» περιλαμβάνει τον εντοπισμό των ατόμων που φέρουν ήδη προ-νεοπλασματικές αλλοιώσεις και η χορήγηση παραγόντων στοχεύει στην πρόληψη της εξέλιξης της νόσου. Τέλος, «τριτοβάθμια χημειοπροφύλαξη» ορίζεται η χορήγηση παραγόντων σε ασθενείς που έχουν εμφανίσει μια φορά καρκίνο και είναι σε κίνδυνο για δεύτερη εμφάνιση (Steward and Brown, 2013).

Αναφορικά με τη χημειοπροστατευτική δράση των βοτάνων και των συστατικών τους, η κλινική τους χρήση αφορά και στα τρία προαναφερθέντα στάδια. Ανάλογα με τη φάση της καρκινογένεσης στην οποία δρουν, ταξινομούνται σε παράγοντες αποκλεισμού (blocking agents), όταν η δράση τους αφορά στη φάση της έναρξης και σε παράγοντες καταστολής (suppressing agents), όταν επιδρούν σε μεταγενέστερα στάδια, δηλαδή αυτά της προαγωγής, της εξέλιξης, της αγγειογένεσης και της μετάστασης (Liu, 2004; Steward and Brown, 2013). Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα βιβλιογραφικής ανασκόπησης, αναφορικά με τη χημειοπροστατευτική δράση βοτάνων και συστατικών τους καθώς και των υποκείμενων μηχανισμών, που αποτέλεσαν σημεία μελέτης της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

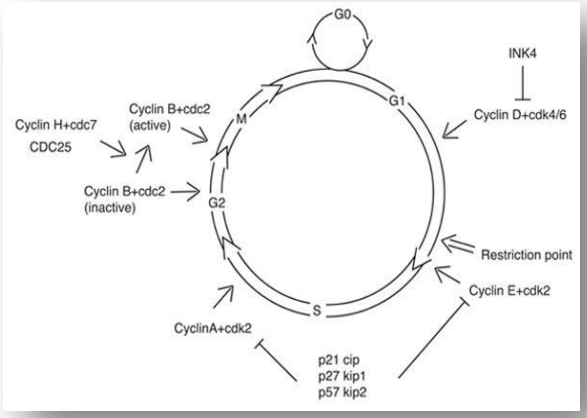
1.8.2 Αναστολή του Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού

Τα τελευταία χρόνια έντονο πεδίο έρευνας αποτελεί η ανάδειξη βοτάνων ως χημειοπροστατευτικών παραγόντων, μέσω της ικανότητάς τους να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων ποικίλλων τύπων. Από τα βότανα της οικογένειας Lamiaceae έχουν μελετηθεί περισσότερο η Ρίγανη, το Δενδρολίβανο, το Μελισσόχορτο, το Φασκόμηλο, και το Τσάι. Αναλυτικότερα, το αιθανολικό εκχύλισμα Ρίγανης έχει βρεθεί αποτελεσματικό στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των Caco2 κυττάρων (καρκινική σειρά του παχέος εντέρου). Η δράση του εκχυλίσματος ήταν εκλεκτική, καθώς επίδραση με την ίδια συγκέντρωση σε υγιή κύτταρα δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στον αριθμό των κυττάρων. Στην ίδια μελέτη αποδείχθηκε ότι το δραστικό συστατικό του εκχυλίσματος είναι το ροσμαρινικό οξύ (Savini *et al.*, 2009). Η δράση του εκχυλίσματος από Ρίγανη, ενισχύεται από τα αποτελέσματα της πρόσφατης μελέτης των Marrelli και συνεργατών, στην οποία σημειώθηκε μείωση της τάξης του 50 % στην πολλαπλασιαστική ικανότητα των LoVo κυττάρων, ύστερα από επώαση με 100 μg/mL εκχυλίσματος για 48 h (Marrelli *et al.*, 2015). Αναφορικά με τη δράση του ροσμαρινικού οξέος, πολλές επιστημονικές ομάδες έχουν εστιάσει την έρευνά τους στον καρκίνο του παχέος εντέρου, τόσο με διεξαγωγή *in vitro* μελετών, όσο και με *in vivo* κλινικές δοκιμές σε ζωικά μοντέλα (Furtado *et al.*, 2015; Venkatachalam *et al.*, 2016). Η χημειοπροστατευτική του δράση επιβεβαιώνεται και σε καρκινικές σειρές, άλλες από αυτή του παχέος εντέρου, όπως λευχαιμίας (U937) (Moon *et al.*, 2010b), ενώ σε άλλες, όπως ήπατος HepG2, όχι (Wu *et al.*, 2016). Το Δενδρολίβανο είναι ένα ακόμα βότανο της οικογένειας Lamiaceae που έχει μελετηθεί ευρέως. Πιο αναλυτικά, εκχυλίσματα Δενδρολίβανου και κάποια από τα συστατικά του έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων μαστού (Cheung and Tai, 2007; Mothana *et al.*, 2011; Yesil-Celiktas *et al.*, 2010), αίματος (Cheung and Tai, 2007; Mothana *et al.*, 2011; Yesil-Celiktas *et al.*, 2010), τραχήλου (Berrington and Lall, 2012), πνεύμονα,

προστάτη (Yesil-Celiktas *et al.*, 2010), ουροποιητικού (Mothana *et al.*, 2011), παχέος εντέρου (Ibáñez *et al.*, 2012; Yi and Wetzstein, 2011), ωοθηκών (Tai *et al.*, 2012), παγκρέατος (González-Vallinas *et al.*, 2014) και ήπατος (Peng *et al.*, 2007) *in vitro*. Τα εκχυλίσματα Μελισσόχορτου επίσης έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητικών ομάδων. Πιο συγκεκριμένα, οι Lin και συνεργάτες κατέδειξαν την ικανότητα αιθανολικών εκχυλισμάτων Μελισσόχορτου να αναστέλλουν έως και 90 % τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυτταρικών σειρών (Lin *et al.*, 2012). Επιπρόσθετα, οι DeSousa και συνεργάτες (2004) ανέφεραν ότι το αιθέριο έλαιο του Μελισσόχορτου έχει την ικανότητα να αναστέλλει με δοσοεξαρτώμενο τρόπο τη βιωσιμότητα ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών συμπεριλαμβανομένων των A 549 (πνεύμονας), HL-60 και K562 (λευχαιμία), MCF-7 (μαστός), Caco-2 (κόλον) (de Sousa *et al.*, 2004). Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν οι Weidner και συνεργάτες, οι οποίοι μελέτησαν τον τρόπο δράσης υδρο-αιθανολικού εκχυλίσματος Μελισσόχορτου σε καρκινικές σειρές του παχέος εντέρου (HT29 και T84) (Weidner *et al.*, 2015). Τέλος, αναφορά γίνεται και στην αντινεοπολλαπλασιαστική δράση του υδατικού εκχυλίσματος Μελισσόχορτου σε κύτταρα HCT-116 (Encalada *et al.*, 2011). Πλήθος άλλων μελετών καταδεικνύουν τη χημειοπροστατευτική δράση των φυτοχημικών συστατικών των βοτάνων σε καρκινικές κυτταρικές σειρές, *in vitro*, όπως και *in vivo*, σε ζωικά πρότυπα ή σε ανθρώπους (Connors *et al.*, 2012; Russo *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2013; Spagnuolo *et al.*, 2012; Steele *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2004).

1.8.3 Αναστολή της Εξέλιξης του Κυτταρικού Κύκλου

Ως κυτταρικός κύκλος χαρακτηρίζεται το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την εκκίνηση μιας κυτταρικής διαίρεσης έως ολοκλήρωσής της, οπότε και εκκινείται νέα διαίρεση. Πρόκειται για μια αυστηρά ελεγχόμενη διαδικασία, με σημεία ελέγχου, η απορύθμιση της οποίας σηματοδοτεί τη δημιουργία όγκων (Araújo *et al.*, 2011). Τα σημεία έλεγχου του κύκλου είναι τρία και τα μόρια που τα ελέγχουν διακρίνονται σε επαγωγικά: οι κυκλινο-εξαρτώμενες πρωτεϊνικές κινάσες (cyclin-dependent kinases, Cdk 1, 2, 4 ή 6) και οι υπομονάδες κυκλίνης (A, B, Ds ή E) καθώς και σε ανασταλτικά: η p53 και πρωτεΐνες αναστολείς, όπως η p21WAF1, η p27KIP1 και η φωσφορυλιωμένη μορφή του ρετινοβλαστώματος (p-RB) (Εικόνα 1.5) (Alao, 2007; Gupta *et al.*, 2003b; Murray, 2004; Soobrattee *et al.*, 2006). Η διαταραχή και η απορρύθμιση που παρατηρούνται στον καρκίνο είναι αποτέλεσμα πιθανώς της υπερέκφρασης των κυκλινών και των Cdk ή/και της απενεργοποίησης των αναστολέων των Cdk. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αυξημένη συγκέντρωση της κυκλίνης D1, η μεταβολή της οποίας καταγράφεται σε πολλούς τύπους καρκίνου, ως πιθανός μηχανισμός απορρύθμισης του κυτταρικού κύκλου (Athar *et al.*, 2009).



Εικόνα 1.5 Στάδια κυτταρικού κύκλου και σημεία ελέγχου

Πολλά είναι τα φαινολικά συστατικά που έχουν μελετηθεί αναφορικά με την ικανότητα τους να αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο, με μηχανισμό που στις περισσότερες τον περιπτώσεων είναι ξεκαθαρισμένος. Η δυνατότητα της κερκετίνης να παρεμβαίνει στα σημεία έλεγχου του κυτταρικού κύκλου έχει μελετηθεί εκτενώς. Πιο αναλυτικά, το μόριο της κερκετίνης προκαλεί αναστολή του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G0/G1, S και G2/M σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του αίματος και του παχέος εντέρου (Kim *et al.*, 2005; Mertens-Talcott and Percival, 2005). Οι ερευνητές μάλιστα παρατήρησαν ότι το είδος της αναστολής επηρεάζεται τόσο από την καρκινική σειρά που μελετάται αλλά και από τη χορηγούμενη δόση. Συγκεκριμένα, επώαση των καρκινικών κυττάρων Caco2 με κερκετίνη (5 μM) προκάλεσε αναστολή στη φάση S του κυτταρικού μέσω μείωσης της έκφρασης των Cdk 6, Cdk 4 και κυκλίνης D1, ενώ επίδραση με 50 μM κερκετίνης οδήγησε σε περαιτέρω μείωση της G0/G1, λόγω επαγωγής της απόπτωσης (van Erk *et al.*, 2005).

Η επαγωγή της αναστολής του κυτταρικού κύκλου από την απιγενίνη, έχει επίσης μελετηθεί. Συγκεκριμένα, στη μελέτη των Yin και συνεργατών (2001) η επώαση καρκινικών κυττάρων μαστικού αδένα (MCF-7 και MDA-MB-468) με απιγενίνη προκάλεσε σημαντική μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων μέσω αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η απιγενίνη δρα χημειοπροστατευτικά αφορά στη μείωση των επιπέδων της κυκλίνης B1 και της Cdk 1. Η εξειδίκευση της δράσης της, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο που μελετάται, επιβεβαιώνεται στην προαναφερθείσα μελέτη καθώς η επώαση για 12 h με απιγενίνη μείωσε σημαντικά τα επίπεδα της p-RB στα MCF-7, και όχι στα MDA-MB-468 (Yin *et al.*, 2001).

Στη μελέτη των Gupta και συνεργατών, η επώαση καρκινικών κυτταρικών σειρών του προστάτη (LNCaP και DU145) με EGCG, οδηγεί στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη

φάση G0/G1. Η αξιολόγηση του συνόλου των αποτελεσμάτων οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο μηχανισμός για την παρατηρούμενη αναστολή σχετίζεται με (α) ενεργοποίηση της έκφρασης των p21WAF1, p27KIP1, p16INK4a, και p18INK4c, (β) αναστολή της έκφρασης των κυκλινών D1 και E, των Cdk 2, Cdk 4, Cdk 6, αλλά όχι της κυκλίνης D2, (γ) αυξημένη δέσμευση της κυκλίνης D1 στο σύμπλεγμα p21WAF1 και p27KIP1, και (δ) μειωμένη δέσμευση της κυκλίνης E στην Cdk 2 (Gupta *et al.*, 2003a). Η ικανότητα του EGCG να επάγει την αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G0/G1 έχει επιβεβαιωθεί και στα YCU-N861 και YCU-H891 κύτταρα. Η δράση του έγκειται στην τροποποίηση της έκφρασης της κυκλίνης D1 και των πρωτεϊνών p21CIP1 και p27KIP1 (Masuda *et al.*, 2001).

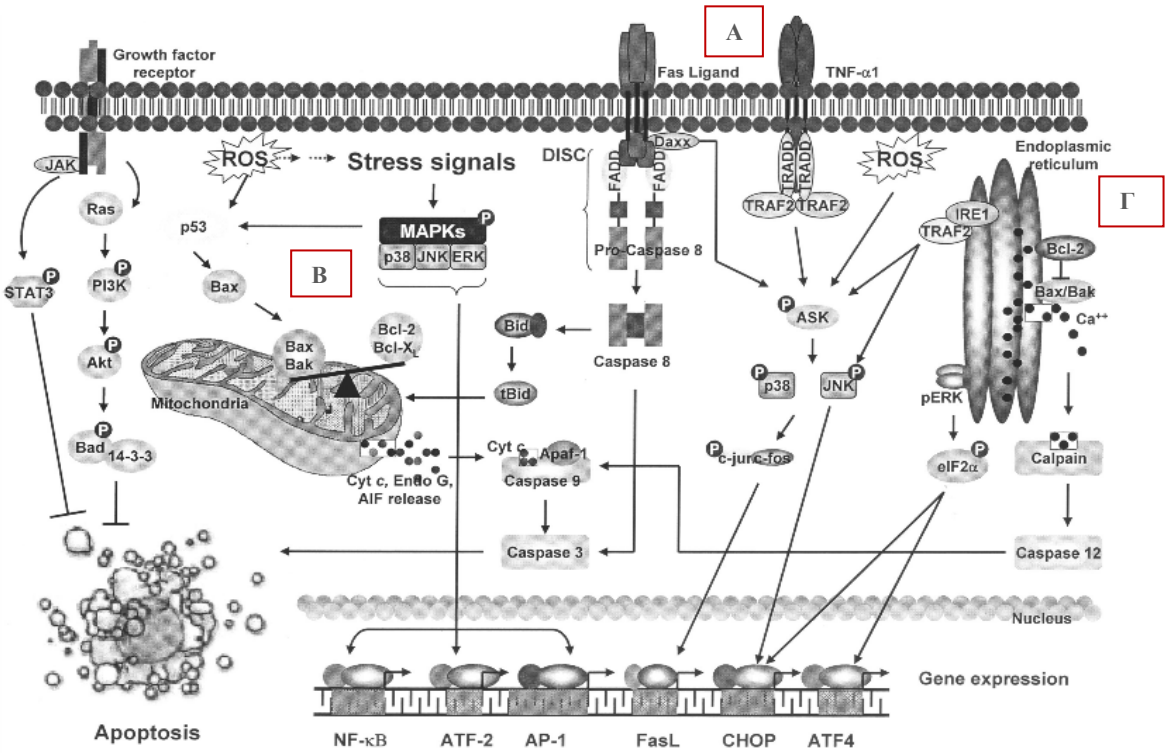
Ο μηχανισμός εκδήλωσης της αντινεοπλασματικής δράσης που επιδεικνύουν τα φυτοχημικά, δεν εξαρτάται μόνο από τον κυτταρικό τύπο αλλά και από τη δομή του μορίου. Η σχέση δομής-δράσης δημοσιεύτηκε από τους Larrosa και συνεργάτες, οι οποίοι εξέτασαν την επίδραση διαφόρων πολυφαινολών στις κυκλίνες. Στη συγκεκριμένη μελέτη βρέθηκε ότι η παρουσία δύο μορίων OH σε *meta* θέση φάνηκε να έχει αρνητική συσχέτιση με την ανασταλτική δράση των μορίων στις πρωτεΐνες που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο (Larrosa *et al.*, 2003). Η περαιτέρω διερεύνηση προς αυτή την κατεύθυνση θα συμβάλει στη διαλεύκανση των μηχανισμών δράσης.

Αναφορικά με τα βότανα, η ικανότητά τους να παρεμβαίνουν στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου καρκινικών κυττάρων έχει επίσης μελετηθεί. Συγκεκριμένα, οι Savini και συνεργάτες μελέτησαν τη δράση αιθανολικού εκχυλίσματος Ρίγανης σε καρκινική σειρά του παχέος εντέρου (Caco2). Από τα αποτελέσματα της μελέτης προκύπτει ότι επώαση για 24 h με 500 μg/mL εκχυλίσματος, οδηγεί σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M (Savini *et al.*, 2009). Ολοκληρώνοντας, επιβεβαιωμένη είναι η ικανότητα και αιθανολικού εκχυλίσματος Μελισσόχορτου (600 μg/mL) να επάγει την αναστολή του κυτταρικού κύκλου υττάρων HT29 στη φάση G2/M έπειτα από επώαση 24 και 48 h, μέσω μείωσης της έκφρασης των Cdk 2, 4, 6 και της κυκλίνης D3 και ταυτόχρονης επαγωγής της έκφρασης των αναστολέων των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών 2C (p18) και 1A (p21) (Weidner *et al.*, 2015).

1.8.4 Επαγωγή της Απόπτωσης

Τα είδη κυτταρικού θανάτου που λαμβάνουν χώρα στους πολυκύτταρους οργανισμούς, κατηγοριοποιούνται σε απόπτωση (Τύπος I), αυτοφαγία (Τύπος II) και νέκρωση (Τύπος III), χωρίς ωστόσο να είναι πάντα διακριτά τα μεταξύ τους όρια (Kanadaswami *et al.*, 2005; Lockshin and Zakeri, 2004). Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ή απόπτωση είναι μια

πολύπλοκη διαδικασία σύμφωνα με την οποία τα ίδια τα κύτταρα εκκινούν έναν σηματοδοτικό καταρράκτη «αυτοκαταστροφής», ως απάντηση σε ερεθίσματα. Τα βασικά μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων που υπόκεινται στη διαδικασία της απόπτωσης περιλαμβάνουν την τροποποίηση της κυτταρικής μεμβράνης, τη συρρίκνωση του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα, τη συμπύκνωση της χρωματίνης και τον κατακερματισμό/θραυσματοποίηση του DNA λόγω της ενεργοποίησης DNA ενδονουκλεασών (Lopaczynski and Zeisel, 2001). Αναφέρεται στο σημείο αυτό, ο ρόλος των μακροφάγων στην αναγνώριση και εκκαθάριση των αποπτωτικών κυττάρων προτού υποστεί ρήξη η πλασματική τους μεμβράνη, χωρίς τη διαμεσολάβηση των διαδικασιών της φλεγμονώδους αντίδρασης (Dai and Mumper, 2010a). Σε μοριακό επίπεδο, δυο είναι οι μηχανισμοί που έχουν πλήρως χαρακτηριστεί. Ο πρώτος μηχανισμός ή εξωγενές μονοπάτι μεσολαβείται από τους υποδοχείς κυτταρικού θανάτου (DR, death receptors) DR3-5, CD95/Fas/Apo1 και τους υποδοχείς 1 και 2 του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF) (Degterev *et al.*, 2003), ενώ ο δεύτερος μηχανισμός ή ενδογενές μονοπάτι μεσολαβείται από τα μιτοχόνδρια (Ziegler and Kung, 2008). Παρόλο που στην εκάστοτε περίπτωση διαφορετικά πρωτεϊνικά μόρια ενεργοποιούνται και οι δυο μηχανισμοί περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση κασπασών και DNA ενδονουκλεασών με τελικό αποτέλεσμα τη διάσπαση λειτουργικών και δομικών μορίων, και κατ' επέκταση τον κυτταρικό θάνατο (Johnson, 2002; MacFarlane and Williams, 2004). Πιο συγκεκριμένα, κατά το εξωγενές μονοπάτι, το πρώτο μόριο που ενεργοποιείται είναι η κασπάση-8 ενώ κατά το ενδογενές μονοπάτι, η κασπάση-9. Στη δεύτερη περίπτωση η διάδοση του αποπτωτικού σήματος ρυθμίζεται κυρίως από πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2, όπως οι Bcl-2, Bcl-x_L και Bcl-w, οι οποίες ασκούν αντιαποπτωτικές και οι Bid, Bad, Bak, Bax και Bim, οι οποίες ασκούν προαποπτωτικές επιδράσεις. Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν, την παρουσία ενός τρίτου μονοπατιού που μεσολαβείται από το ενδοπλασματικό δίκτυο κατά το οποίο η διάδοση του σήματος επάγεται επίσης από κασπάσες (Εικόνα 1.6) (Pan *et al.*, 2008; Ramos, 2007; Reuter *et al.*, 2008).



Εικόνα 1.6 Μοριακά σηματοδοτικά μονοπάτια επαγωγής της απόπτωσης. Οι οδοί σήμανσης της αποπτωτικής διαδικασίας περιλαμβάνουν έναν καταρράκτη ενεργοποίησης κασπασών, που τελικά οδηγεί στην ενεργοποίηση της κασπάσης-3. Ανάλογα με το είδος του ερεθίσματος και του κυττάρου, διακρίνονται (A) το εξωγενές μονοπάτι που μεσολαβείται από τους υποδοχείς κυτταρικού θανάτου (DR, death receptors) DR3-5, CD95/Fas/Apo1 και τους υποδοχείς 1 και 2 του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF), με ακολουθούμενη την ενεργοποίηση της κασπάσης-8 και (B) το ενδογενές μονοπάτι που μεσολαβείται από τα μιτοχόνδρια ως απόκριση σε κυτταρικό στρες, απώλεια παραγόντων επιβίωσης και άλλων ερεθισμάτων ανάπτυξης. Η δημιουργία πόρων στη μεμβράνη επιτρέπει την απελευθέρωση κυτοχρώματος c, Engo G, και AIF στο κυτταρόπλασμα. Ακολούθως, το κυτόχρωμα c προσδένεται, στον παράγοντα Apaf-1 (apoptosis-protease-activating factor-1) οδηγώντας στην ενεργοποίηση της κασπάσης-9. Τελικά, οι κασπάσες-8, 9 και 3 διασπούν πλήθος κυτταρικών πρωτεϊνών, όπως δομικές και πυρηνικές πρωτεΐνες, πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού αλλά και σηματοδοτικά μόρια που οδηγούν τελικά τα κύτταρα σε απόπτωση. Τέλος, (Γ) στο μονοπάτι που μεσολαβείται από το ενδοπλασματικό δίκτυο επάγεται η ενεργοποίηση της κασπάσης-12 (Pan *et al.*, 2008)

Τα τελευταία χρόνια, η εντατική έρευνα σχετικά με τη χημειοπροστατευτική δράση των φυτοχημικών έχει οδηγήσει στη μερική κατανόηση των μηχανισμών μέσω των οποίων τα συστατικά αυτά επάγουν την απόπτωση καρκινικών κυττάρων. Φαίνεται ότι η αντινεοπλασματική δράση των φυτοχημικών και συγκεκριμένα των πολυφαινολών, πυροδοτείται από την τροποποίηση πολλών βασικών μορίων, τα οποία συμμετέχουν σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος που συνδέονται με την απόπτωση, πχ κασπάσες και γονίδια της οικογένειας *bcl-2* (Manson, 2003; Watson *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001). Ορισμένοι μηχανισμοί που διέπουν την *in vitro* αντινεοπλασματική δράση των πολυφαινολών παρατίθενται στον Πίνακα 1.3.

Πίνακας 1.3 Εμπλεκόμενα μόρια στο σηματοδοτικό καταρράκτη επαγωγής της απόπτωσης από πολυφαινόλες, σε *in vitro* δοκιμές σε πειραματικά μοντέλα σε κυτταρικές σειρές απομονωμένες από ανθρώπινους όγκους

Φαινολικό συστατικό	**Επίδραση**	***In vitro* μοντέλο**	**Αναφορά**
EGCG	↑ κασπάση-9 και Bax ↓ Bcl-2, Bcl-x_L, p-EGFR, p-STAT-3 και p-ERK	YCU-H891, YCU-H861	(Yi *et al.*, 2005)
	↑ Fas, Bax και p53	HepG2	(Kuo and Lin, 2003)
	↓ PI-3K και AKT ↑ ERK1/2	LNCaP	(Siddiqui *et al.*, 2004)
	↑ κασπάση-3 και κασπάση-9 ↓ p-EGFR, p-HER2, p-AKT και p-ERK	HT29	(Shimizu *et al.*, 2005)
Κερκετίνη	↑ κασπάση-3, κασπάση-7 και Bax	CNE2	(Ong *et al.*, 2004)
	↑ κασπάση-3 ↓ AKT και ERK1/2	Αρχική καλλιέργεια νευρώνων	(Spencer *et al.*, 2003)
Λουτεολίνη	↑ κασπάση-3/7, κασπάση-8/10 και κασπάση-9	H4IIE	(Michels *et al.*, 2005)
	↑ κασπάση-3, κασπάση-8, κασπάση-7 και PARP ↓ Bcl-x_L	HLF	(Selvendiran *et al.*, 2006)
	↑ της μετατόπισης Bax/Bak και JNK	HepG2	(Lee *et al.*, 2005)
Απιγενίνη	↑ της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος, κασπάση-3 και κασπάση-9	HL-60	(Wang *et al.*, 1999)
	↑ κασπάση-3, κασπάση-8, κασπάση-7 και PARP	HLF	(Selvendiran *et al.*, 2006)
Γενιστεΐνη	↑ p38 ↓ ERK1/2	MCF-10F	(Frey and Singletary, 2003)
	↓ Bcl-x_L, AKT και EGFR	A549	(Park and Seol, 2002)

Η αντινεοπλασματική δράση των οργανικών εκχυλισμάτων των βοτάνων έχει εκτιμηθεί σε λίγες μόνο περιπτώσεις συμβάλλοντας στην κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους τα βότανα προάγουν την υγεία. Όσον αφορά μελέτες στον καρκίνο του παχέος έντερου, στα εμπλεκόμενα μόρια που σηματοδοτούν την απόπτωση συγκαταλέγονται οι πρωτεΐνες: κασπάση-3, 7, 8 και 9, PARP, Bcl-x_L, Bak και Apaf-1. Στην εκκίνηση της αποπτωτικής διαδικασίας σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν η εξάντληση ή/και η παραγωγή μορίων που είναι σε θέση να μεταβάλουν την οξειδωτική κατάσταση των καρκινικών κυττάρων (Savini *et al.*, 2009; Weidner *et al.*, 2015).

1.8.5 Αντιφλεγμονώδης Δράση

Η αλληλοεξαρτώμενη σχέση φλεγμονής-καρκίνου είναι επιβεβαιωμένη. Μελέτες αναφέρουν ότι η φλεγμονή, ανάλογα με τον τύπο καρκίνου, μπορεί να είναι η αιτιολογία για την εμφάνιση κακοηθειών ή το έμμεσο αποτέλεσμα μιας μετάλλαξης ογκογονιδίου, το οποίο επάγει τη δημιουργία φλεγμονώδους μικροπεριβάλλοντος. Η συμβολή της φλεγμονής στη διαδικασία της καρκινογένεσης αφορά σε όλα τα στάδια εξέλιξης της νόσου και σχετίζεται με την προαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, την επιβίωση, την αγγειογένεση και τη μετάσταση (Mantovani, 2009; Vendramini-Costa and Carvalho, 2012). Μερικά από τα μόρια που συμμετέχουν ενεργά στην επαγωγή της φλεγμονής παρουσιάζονται στη συνέχεια.

1.8.5.1 Πυρηνικός Παράγοντας- kappa B (NF-κB)

Ο πυρηνικός παράγοντας NF-κB είναι μια διμερής πρωτεΐνη που δρα ως μεταγραφικός παράγοντας, τουλάχιστον 200 γονιδίων που κωδικοποιούν κυτταροκίνες, υποδοχείς κυτταροκινών, και μορίων κυτταρικής προσκόλλησης και στο σύνολό τους εμπλέκονται σε ανοσολογικές και φλεγμονώδεις αποκρίσεις, και σε σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση. Οι πρωτεΐνες που απαρτίζουν το μόριό του ανήκουν στην ευρύτερη ομάδα των πρωτεϊνών Rel. Ανάλογα με το είδος των πρωτεϊνών διακρίνονται έξι μέλη: ο NF-κB1 (p50/ p105), ο NF-κB2 (p52/ p100), ο RelA (p65), ο RelB (p68), ο c-Rel (p75) και ο v-Rel (Baldwin, 2001; Ghosh *et al.*, 1998; Gilmore, 2006; Haddad and Abdel-Karim, 2011).

Σε καταστάσεις ηρεμίας ή απουσίας ερεθίσματος, ο NF-κB βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, δεσμευμένος στις πρωτεΐνες IκB (IκBα, IκBβ, IκBε). Η μετανάστευσή του στον πυρήνα και η σύνδεσή του στις αλληχουχίες του DNA τις οποίες ελέγχει (κB), προάγεται από προφλεγμονώδη και οξειδωτικά ερεθίσματα. Τα βήματα που έπονται του ερεθίσματος αφορούν στη φωσφορυλίωση της IkB από την κινάση της (IKK) ή από τις MAPKs, γεγονός που οδηγεί στην ουβικιτινίωση της (αποδόμησή της από το πρωτεόσωμα) και συνεπώς στην απελευθέρωση του NF-κB (Baldwin, 2001; Johnson, 2007; Shishodia and Aggarwal, 2004; Vendramini-Costa and Carvalho, 2012).

1.8.5.2 Ενεργοποιούσα Πρωτεΐνη-1

Ο μεταγραφικός παράγοντας AP-1 είναι μια ομο- ή ετεροδιμερής πρωτεΐνη που περιλαμβάνει μέλη των JUN (c-Jun, JunB, JunD) και FOS (c-Fos, FosB, Fra-1 και Fra-2) οικογενειών (Kundu *et al.*, 2006). Ο ρόλος της, στην προαγωγή του καρκίνου σχετίζεται, ομοίως με τον NF-κB, με τα

γονίδια τα οποία ελέγχει. Πιο αναλυτικά, η AP-1 ενεργοποιείται από ερεθίσματα κυτταροκινών, αυξητικών παραγόντων και οξειδωτικού στρες, μέσω των ERK, JNK και MAPKs σηματοδοτικών μονοπατιών. Τα γονίδια που υπόκεινται της ρύθμισής της ανήκουν στις κυτταροκίνες, ογκοπρωτεΐνες, παράγοντες ανάπτυξης και σε μόρια που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην διαφοροποίηση και στην απόπτωση κυττάρων. Μελέτες επίσης έχουν δείξει ότι η ενεργοποίηση του AP-1 σχετίζεται με την προαγωγή και την εξέλιξη του καρκίνου, μέσω ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων: κυκλίνη D1, A και E, p53, p21CIP1, p16INK4a, p19ARF, δράση που επηρεάζεται από το είδος του κυττάρου (Eferl and Wagner, 2003; Hess *et al.*, 2004; Klaunig *et al.*, 2010; León-González *et al.*, 2015; Suzuki *et al.*, 1994).

1.8.5.3 Κυκλοξυγονάση (COX)

Οι κυκλοξυγονάσες ή συνθετάσες Η των προσταγλανδινών είναι τα υπεύθυνα ένζυμα του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος, το οποίο απελευθερώνεται από την κυτταρική μεμβράνη, προς παραγωγή προσταγλανδινών (PG) (Aggarwal *et al.*, 2009). Ο ρόλος των προαναφερθέντων ενζύμων στη προαγωγή και εξέλιξη του όγκου αφορά στην ικανότητα των προϊόντων που συνθέτουν να επάγουν τη φλεγμονώδη αντίδραση και την επιβίωση, να τροποποιούν τη ροή του αίματος σε όργανα/ ιστούς, να ελέγχουν τη μεταφορά σιδήρου δια μέσου των μεμβρανών κ.α.

Υπάρχουν δύο ισομορφές: (α) η COX-1, η οποία εκφράζεται στο σύνολο των κυτταρικών τύπων, συνθέτοντας προσταγλανδίνες σημαντικές για τη συσσώρευση αιμοπεταλίων καθώς και για τη διατήρηση της ακεραιότητας του γαστρικού βλεννογόνου και (β) η COX-2, η οποία αν και φυσιολογικά δεν εκφράζεται στην πλειοψηφία των κυτταρικών τύπων, η έκφρασή της επάγεται από πολλά προφλεγμονώδη μόρια και αυξητικούς παράγοντες, συνθέτοντας προσταγλανδίνες που εμπλέκονται σε διαδικασίες ανάπτυξης φλεγμονής (Gupta *et al.*, 2002; Johnson, 2007). Μάλιστα, έχει επιβεβαιωθεί ότι η συγκεκριμένη ισομορφή υπερεκφράζεται στο 40 % όλων των καρκινικών τύπων και στο 85 % των καρκινωμάτων του παχέος εντέρου (Eberhart *et al.*, 1994). Η υπερέκφραση της COX-2 έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη σύνθεση της προφλεγμονώδους PGE2, η οποία ενεργοποιεί τον PPAR-δ, το αντιαποπτωτικό μονοπάτι PI3K/AKT και τις αντιαποπτωτικές πρωτείνες (μέλη της οικογένειας Bcl-2) (Aravindaram and Yang, 2010; Gupta *et al.*, 2004; Sinicrope and Gill, 2004).

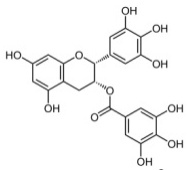
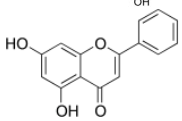
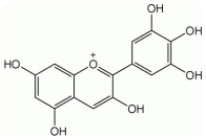
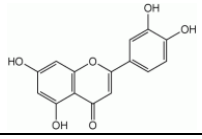
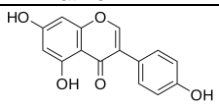
1.8.5.4 Κυτταροκίνες και Χημειοκίνες

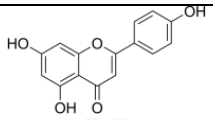
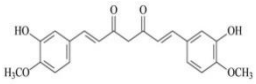
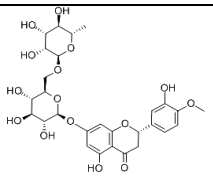
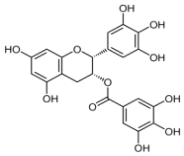
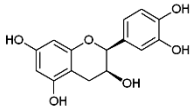
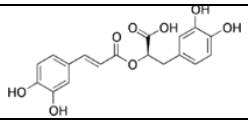
Σε καταστάσεις φλεγμονής τα επίπεδα προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως IL-1, IL-6, IL-15, IL-17, IL-23 και TNF-α αυξάνονται. Τα μόρια αυτά παράγονται τόσο από καρκινικά κύτταρα όσο από στρωματικά κύτταρα, κυρίως για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών του μικροπεριβάλλοντος του. Επίσης, οι χημειοκίνες, μόρια που επάγουν τον χημειοτακτισμό, με κυριότερη την IL-8, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην απόπτωση, τον πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση και τη μετάσταση των όγκων. Πιο αναλυτικά, η έκκρισή τους από καρκινικά και παρακείμενα κύτταρα έγκειται στην προσέλκυση λευκοκυττάρων (κατά κύριο λόγο μονοπύρηνων), τα οποία εκκρίνουν παράγοντες ανάπτυξης και αγγειογενετικούς παράγοντες, μόρια απαραίτητα για τη διέγερση της εξέλιξης του όγκου (Aravindaram and Yang, 2010; Suganuma *et al.*, 2006; Vendramini-Costa and Carvalho, 2012).

1.8.5.5 Μηχανισμοί Δράσεις των Φυτοχημικών

Οι γνώσεις μας αναφορικά με τους μηχανισμούς με τους οποίους τα βότανα επιτελούν τη αντιφλεγμονώδη δράση τους είναι περιορισμένες. Αντίθετα, η εντατική και εκτεταμένη έρευνα που αφορά στον τρόπο δράσης των φυτοχημικών, διαλεύκανε εν μέρει τους μηχανισμούς μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η αναστολή και ο έλεγχος των καρκινογενετικών διαδικασιών.

Πίνακας 1.4 Μόρια «στόχοι» φαινολικών συστατικών κατά την εκδήλωση αντιφλεγμονώδους δράσης σε διάφορους τύπους ανθρώπινων νεοπλασιών

Τύπος καρκίνου	Φαινολικό Συστατικό	Δομή	Δράση	Αναφορά
κόλον	EGCG		↓ mRNA IL-8	(Porath *et al.*, 2005)
	χρυσίνη		Αναστολή NF-κB	(Romier *et al.*, 2008)
	δελφινιδίνη		Αναστολή IκB-α	(Yun *et al.*, 2009)
	λουτεολίνη		↓ COX-2 μέσω ↓ NF-κB	(Karrasch *et al.*, 2007)
	γενιστεΐνη		↓ COX-2 και IL-8	(Mutoh *et al.*, 2000)

Τύπος καρκίνου	Φαινολικό Συστατικό	Δομή	Δράση	Αναφορά
προστάτη	απιγενίνη		↓ HIF-1α μέσω I3K/Akt/GSK-3	(Mirzoeva *et al.*, 2008)
	κουρκουμίνη		↓ AP-1	(Moul *et al.*, 2002)
πνεύμονα	εσπεριδίνη		↓ IL-8 και ICAM μέσω ↓ NF-κB και AP-1	(Yeh *et al.*, 2007)
	EGCG		↓ IL-8	(Kim *et al.*, 2006)
	EC		↓ IL-8	(Kim *et al.*, 2006)
λευχαιμία	ροσμαρινικό οξύ		Αναστολή NF-κB	(Moon *et al.*, 2010a)

1.9 Επιδημιολογικές Μελέτες

Πολλές είναι οι επιδημιολογικές μελέτες που συνδέουν τη διατροφική πρόσληψη πολυφαινολών με την πρόληψη καρδιαγγειακών νοσημάτων και καρκίνου. Από τις πρώτες έρευνες στις οποίες παρατηρήθηκε η σημασία των συστατικών αυτών στην πρόληψη της καρδιαγγειακής νόσου ήταν η μελέτη των Επτά Χωρών. Σύμφωνα με τα ευρήματα της μελέτης, η κατανάλωση φρούτων, λαχανικών, αλλά και παραδοσιακών αφεψημάτων, έχει προστατευτικό ρόλο στην υγεία (Keys *et al.*, 1986). Αργότερα, και άλλες επιδημιολογικές μελέτες επιβεβαίωσαν την αρνητική συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης των πλούσιων σε φαινολικά συστατικά τροφίμων και της καρδιαγγειακής νόσου (Dauchet *et al.*, 2005; Hu, 2003; Ness and Powles, 1997; Nöthlings *et al.*, 2008). Τα παραπάνω ευρήματα επιβεβαιώνονται και σε μελέτες που εξέτασαν επιμέρους φαινολικά συστατικά (Edwards *et al.*, 2007), ενώ από τα βότανα έχει αξιολογηθεί κυρίως ο προστατευτικός ρόλος του αφεψήματος πράσινου Τσαγιού στα καρδιαγγειακά νοσήματα (Trevisanato and Kim, 2000).

Αναφορικά με τον καρκίνο, έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές επιδημιολογικές μελέτες που επιβεβαιώνουν την προστατευτική δράση των πολυφαινολών σε επίπεδο πρωτοβάθμιας χημειοπροφύλαξης (Arts *et al.*, 2001; De Stefani *et al.*, 1999; Knekt *et al.*, 2002; Lambert and

Yang, 2003; Le Marchand *et al.*, 2000). Αναφορικά με την κατανάλωση βοτάνων, αντικείμενο μελέτης έχουν αποτελέσει το πράσινο και το μαύρο Τσάι, κυρίως σε καρκίνους που σχετίζονται με τη διατροφή. Συγκεκριμένα, η κατανάλωση πράσινου Τσαγιού φάνηκε να σχετίζεται αρνητικά με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Η προστατευτική του δράση συνδέθηκε και με την εξέλιξη της νόσου, καθώς βρέθηκε αρνητική σχέση μεταξύ κατανάλωσης του αφεψήματος και μετάστασης για τον ίδιο καρκινικό τύπο (Nakachi *et al.*, 1998). Η χημειοπροστατευτική δράση του αφεψήματος από πράσινο Τσάι έχει επιβεβαιωθεί και για άλλους τύπους καρκίνου, σε επιδημιολογική μελέτη στην οποία συμμετείχαν 8532 άτομα (Imai *et al.*, 1997). Αντίθετα με την κατανάλωση πράσινου Τεΐου, η διατροφική πρόσληψη μαύρου Τεΐου δε φαίνεται να έχει κάποια ανασταλτική δράση στον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου. Συγκεκριμένα, στη μελέτη των Goldbohm και συνεργατών όπου συμμετείχαν 58279 άνδρες και 62573 γυναίκες η κατανάλωση μαύρου Τεΐου δεν τροποποίησε την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου, του στομάχου, του πνεύμονα και του μαστού (Goldbohm *et al.*, 1996).

Η ανάγκη για τη διεξαγωγή επιπλέον κλινικών δοκιμών ώστε να αξιολογηθεί η συμβολή των αφεψημάτων στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης ασθενειών, οι οποίες θα έπονται μελετών για την ασφαλή τους κατανάλωση κρίνεται σημαντική. Εκτός των μελετών τοξικότητας, πριν από οποιαδήποτε σύσταση διατροφικής παρέμβασης ή κλινικών δοκιμών πρέπει να πραγματοποιηθούν μελέτες σχετικά με την πιθανή αλληλεπίδραση των βοτάνων με τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται έως τώρα για την θεραπεία των προαναφερθέντων νοσημάτων.

1.10 Σκοπός

Τα αρωματικά φυτά χρησιμοποιούνται από την αρχαιότητα για θεραπευτικούς και καλλωπιστικούς σκοπούς, για την προσθήκη αρώματος και γεύσης στα τρόφιμα, όπως και για τη συντήρησή τους. Αποτελούν βασικά συστατικά της Μεσογειακής διατροφής που συνδυάζει τις γευστικές απολαύσεις και την ποικιλία με τη μακροζωία.

Η Ελλάδα χαρακτηρίζεται από πλούσια χλωρίδα δεδομένου ότι έχουν αναγνωριστεί τουλάχιστον 5000 είδη φυτών, εκ των οποίων 500-600 κατατάσσονται στα αρωματικά φυτά/ βότανα. Η συστηματική καλλιέργεια των βοτάνων στη χώρα μας ωστόσο είναι περιορισμένη κατά τις τελευταίες δεκαετίες. Στις μέρες μας καταγράφεται αύξηση των εκτάσεων που αξιοποιούνται με την καλλιέργεια αρωματικών φυτών, υποκινούμενη από την ανάγκη της βιομηχανίας για την παρασκευή προϊόντων καλλωπισμού φυτικής προέλευσης.

Αν και τα βότανα έχουν μελετηθεί εκτεταμένα, εν τούτοις οι περισσότερες μελέτες αναφέρονται στα ανεπεξέργαστα, αποξηραμένα υπέργεια τμήματα των φυτών. Υπάρχουν λίγες σχετικά εργασίες σχετικές με την ανάλυση των αφεψημάτων των βοτάνων -τη μορφή δηλαδή υπό την οποία στην πραγματικότητα καταναλώνονται- και ακόμη πιο λίγες μελέτες που ασχολούνται με τα ενδημικά φυτά της Ελληνικής χλωρίδας. Η σχετική έρευνα με στόχο την ανάδειξη τελικά των αφεψημάτων από βότανα της Ελληνικής χλωρίδας ως λειτουργικών στοιχείων της Μεσογειακής διατροφής, θα ωθήσει σε αύξηση της κατανάλωσης από το σύγχρονο καταναλωτή που αναζητά στο τρόφιμο συστατικά με θετικές επιπτώσεις για υγεία με συνέπεια το όφελος για τη Δημόσια Υγεία. Επιπρόσθετα, η σύνδεση της έρευνας και της κατανάλωσης θα ωθήσει στην επέκταση των καλλιεργειών αυτών των φυτών και συνεπακόλουθα στην ενίσχυση τοπικών οικονομιών, αλλά και της Εθνικής οικονομίας της χώρας.

Με δεδομένα (α) το ερευνητικό κενό και (β) το γεγονός ότι τα αφεψήματα των αρωματικών φυτών βρίσκονται στη βάση της Μεσογειακής πυραμίδας, η παρούσα διατριβή είχε ως βασικό στόχο την ανάδειξη αυτών ως συστατικών της Μεσογειακής διατροφής με ιδιαίτερα οφέλη για την υγεία.

Για τη μελέτη αυτή αρχικά πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός των βιοδραστικών μικροσυστατικών στα αφεψήματα, τα οποία αξιολογήθηκαν αναφορικά με την εκδήλωση αντιοξειδωτικής δράση *in vitro*. Προκειμένου να μελετηθεί η βιοδραστικότητα των

αφεψημάτων, διερευνήθηκε αρχικά η ικανότητά τους να επιδεικνύουν αντιαθηρογόνο δράση *in vitro*. Για το σκοπό αυτό εκτιμήθηκε η ικανότητα των αφεψημάτων (α) να αναστέλλουν την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών του ορού, (β) να επιδρούν στα επίπεδα προφλεγμονωδών παραγόντων, και (γ) να επιδρούν στα επίπεδα χημειοτακτικών μορίων, σε μονοπύρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος.

Σε επόμενο στάδιο, για την περαιτέρω εκτίμηση της βιοδραστικότητας των αφεψημάτων αξιολογήθηκε η χημειοπροστατευτική τους δράσης *in vitro*. Για το σκοπό αυτό εκτιμήθηκε η δράση τους ως παράγοντες καταστολής της καρκινογένεσης σε κυτταρικές σειρές απομονωμένες από ανθρώπινους όγκους, μέσω της ικανότητάς τους (α) να αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, (β) να αναστέλλουν τη μιτοχονδριακή λειτουργία (γ) να επάγουν την απόπτωση των κυττάρων, (δ) να επιδρούν στα επίπεδα προφλεγμονωδών παραγόντων, (ε) να επιδρούν στα επίπεδα της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης, (στ) να επιδρούν στα ενδοκυτταρικά επίπεδα οξειδωτικού στρες, (ζ) να επηρεάζουν τα επίπεδα ενεργοποίησης ή/ και έκφρασης μεταγραφικών παραγόντων.

Μετά από την ολοκλήρωση των πειραμάτων ακολούθησε συσχέτιση ενός ή περισσότερων συστατικών/ δομών ή τάξεων αυτών με μεμονωμένες τις ευεργετικές ιδιότητες των αφεψημάτων.

ΚΕΦΆΛΑΙΟ ΙΙ : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 *Αρωματικά Φυτά (Παραλαβή και Αποθήκευση)*

Τα δεκατρία είδη αρωματικών φυτών της Ελληνικής χλωρίδας που μελετήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1 Αρωματικά φυτά της μελέτης

Α/Α	Κοινή ονομασία	Επιστημονική ονομασία	Οικογένεια	Φύεται
1	Αντωναΐδα	*Origanum microphyllum* (Benth.) Vogel.	Lamiaceae	Ενδημικό, νήσος Κρήτη
2	Δενδρολίβανο	*Rosmarinus officinalis* L.	Lamiaceae	Μεσόγειος
3	Δίκταμο	*Origanum dictamnus* L.	Lamiaceae	Ενδημικό, νήσος Κρήτη
4	Θρύμπα	*Satureja thymbra* L.	Lamiaceae	Μεσόγειος
5	Θυμάρι	*Thymus vulgaris* L.	Lamiaceae	Νότια Ευρώπη
6	Μαντζουράνα	*Origanum majorana* L.	Lamiaceae	Μεσόγειος
7	Μελισσόχορτο	*Melissa officinalis* L.	Lamiaceae	Παγκοσμίως
8	Ρίγανη	*Origanum vulgare* ssp hirtusL.	Lamiaceae	Μεσόγειος, Ν.Δ Ευρώπη
9	Σπαθόχορτο	*Hypericum perforatum* L.	Clusiaceae	Παγκοσμίως
10	Τσάι βουνού	*Sideritis syriaca* L.	Lamiaceae	Μεσόγειος, Ευρώπη
11	Φασκόμηλο	*Salvia officinalis* L.	Lamiaceae	Μεσόγειος
12	Φλισκούνι	*Mentha pulegium* L.	Lamiaceae	Ευρώπη
13	Χαμομήλι	*Matricaria chamomilla* L.	Asteraceae	Ευρώπη, εύκρατη Ασία

Τα βότανα, στην πλειοψηφία τους, προέρχονται από την Κρήτη (Νύβριτος, Νομός Ηρακλείου), με εξαίρεση τα Σπαθόχορτο και Μελισσόχορτο που προέρχονται από την Άνω Πορόϊα του Νομού Σερρών και από βιολογικές καλλιέργειες της Αιτωλοακαρνανίας, αντίστοιχα. Τα βότανα παρελήφθησαν αποξηραμένα σε νάιλον τυποποιημένες συσκευασίες των 250 g και αποθηκεύτηκαν σε ξηρό και σκοτεινό μέρος, σε θερμοκρασία δωματίου.

2.2 *Παρασκευή Αφεψημάτων*

<u>Υαλικά-Αναλώσιμα</u>

Ογκομετρικός κύλινδρος 250 mL

Ποτήρι ζέσεως 250 mL

Δοχείο από βοριοπυριτικό γυαλί (pyrex) 1000 mL

Γυάλινο χωνί

Διηθητικό χαρτί

Πλαστικό δοχείο με βιδωτό πώμα 100 mL

Εμφιαλωμένο μεταλλικό νερό (Ζαγόρι)

Όργανα

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων

Θερμαντική πλάκα

Καταψύκτης (-20 °C)

Αναλυτική πορεία

Σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας ζυγίζονται 3 g βοτάνου και μεταφέρονται σε δοχείο από βοριοπυριτικό γυαλί. Στη συνέχεια προστίθενται με ογκομετρικό κύλινδρο 250 mL εμφιαλωμένου μεταλλικού νερού και το δοχείο τοποθετείται σε προθερμασμένη εστία. Το δοχείο απομακρύνεται από την εστία 3 min μετά την έναρξη βρασμού ενώ η διαδικασία της εκχύλισης συνεχίζεται επί 2 min. Ακολουθεί διήθηση για την απομάκρυνση του στερεού υπολείμματος του βοτάνου και παραλαβή του αφεψήματος σε ποτήρι ζέσεως. Ο όγκος του εκχυλίσματος προσδιορίζεται με ογκομετρικό κύλινδρο και συμπληρώνεται κατάλληλος όγκος μεταλλικού νερού στην περίπτωση που οι απώλειες κατά το βρασμό είναι μεγαλύτερες των 50 mL (τελικός όγκος αφεψήματος 200 mL). Έπειτα, το αφέψημα μεταφέρεται σε προζυγισμένα πλαστικά δοχεία, τα οποία καλύπτονται με parafilm και τοποθετούνται σε καταψύκτη (-20 °C). Η διαδικασία παρασκευής του υδατικού εκχυλίσματος που περιγράφηκε παραπάνω είναι κοινή για όλα τα βότανα της μελέτης.

2.3 Παραλαβή Αφυδατωμένου Αφεψήματος

Υαλικά-Αναλώσιμα

Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες με βιδωτό πώμα καλυμμένο με Teflon, όγκου 10 mL

Όργανα

Βαθυκαταψύκτης (-80 °C)

Συσκευή λυοφιλίωσης

Καταψύκτης (-20 °C)

Αναλυτική πορεία

Η διαδικασία που περιγράφεται στη συνέχεια είναι κοινή για τα δεκατρία βότανα της μελέτης. Τα προζυγισμένα πλαστικά δοχεία τοποθετούνται σε βαθυκαταψύκτη (-80 °C) για 24 h. Στη συνέχεια, τα δοχεία τοποθετούνται σε συσκευή λυοφιλίωσης και λυοφιλιώνται (πίεση 1 mbar, θερμοκρασία -50 °C) επί 72 h. Για τη διόρθωση των αποτελεσμάτων ως προς τα διαλυμένα άλατα του μεταλλικού νερού, εκτελείται ταυτόχρονα λυοφιλίωση ίσου όγκου εμφιαλωμένου μεταλλικού νερού εις τριπλούν. Μετά την πάροδο των 72 h η διαδικασία ολοκληρώνεται με παραλαβή του στερεού υπολείμματος του αφεψήματος το οποίο, αφού ζυγισθεί, τοποθετείται σε γυάλινα φιαλίδια με βιδωτό πώμα και αποθηκεύεται σε θάλαμο ψύξης (-20 °C) υπό συνθήκες σκότους.

2.4 Ποιοτικός και Ποσοτικός Προσδιορισμός Δευτερογενών Μεταβολιτών των Αρωματικών Φυτών στα Αφεψήματα

2.4.1 Προσδιορισμός Συνολικού Φαινολικού Περιεχομένου με τη Μέθοδο Folin- Ciocalteu

Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Ρυθμιζόμενες πιπέττες (10-1000 μL), με τα αντίστοιχα tips
Φιαλίδια eppendorf, χωρητικότητας 1.5 mL
Πολυστυρενικά τρυβλία 96 βοθρίων
Αντιδραστήριο Folin Ciocalteu (FC, 2 N)
Κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου, Na_2CO_3 (20 % w/v)
Μεθανόλη (MeOH) αναλυτικής καθαρότητας
Γαλλικό οξύ (Gallic acid, GA)
Απιονισμένο νερό

Όργανα

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων
Κυκλοαναδευτήρας Vortex
Φωτόμετρο ELISA (ELISA reader) SUNRISE TECAN

Αρχή μεθόδου

Ο προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου των δειγμάτων, χωρίς διάκριση μεταξύ μονομερών, διμερών και πολυμερών φαινολικών συστατικών, βασίζεται στην πραγματοποίηση οξειδοαναγωγικής αντίδρασης με το αντιδραστήριο FC. Το αντιδραστήριο

αυτό αποτελεί διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα και είναι ικανό να οξειδώνει τα φαινολικά ιόντα με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση, της οποίας η στοιχειομετρία δεν είναι γνωστή:

$$P_2W_{18}O_{62}^{-7} \rightarrow H_4P_2W_{18}O_{62}^{-8},\ H_6P_2Mo_{18}O_{62}^{-6} \rightarrow H_6P_2Mo_{18}O_{62}^{-7}$$

Το προϊόν της αντίδρασης είναι σύμπλοκο μολυβδαινίου-βολφραμίου (Mo-W) χαρακτηριστικής κυανής χρώσης, που απορροφά στο ορατό φώς (750 nm). Η αντίδραση πραγματοποιείται σε αλκαλικό περιβάλλον, η ρύθμιση του οποίου γίνεται με κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3 (20% w/v). Η αλκαλικότητα του διαλύματος είναι απαραίτητη για τη σταθερότητα τόσο του αντιδραστηρίου FC όσο και του προϊόντος της αντίδρασης και αποτελεί βασική προϋπόθεση για την παρουσία των φαινολικών ιόντων.

Αναλυτική πορεία

Αρχικά σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας ζυγίζεται ποσότητα λυοφιλιωμένου αφεψήματος και διαλύεται σε κατάλληλο όγκο μεθανόλης, ώστε η συγκέντρωση των δειγμάτων να είναι 4 mg/mL. Στη συνέχεια, σε φιαλίδια eppendorf που περιέχουν 790 μL απιονισμένο νερό προστίθενται 10 μL δείγματος ή 10 μL καθαρής μεθανόλης για το λευκό προσδιορισμό. Ακολουθεί η προσθήκη 50 μL αντιδραστηρίου FC και το μίγμα αναδεύεται ισχυρά σε vortex για 1 min. Έπειτα, προστίθενται 150 μL κορεσμένου διαλύματος Na_2CO_3 (20 % w/v), το μίγμα αναταράσσεται εκ νέου και φυλάσσεται σε σκοτεινό μέρος, για 120 min, σε θερμοκρασία δωματίου (Arnous *et al.*, 2002). Μετά την πάροδο των 2 h, μεταφέρονται με ρυθμιζόμενη πιπέττα 200 μL από το μίγμα σε πολυστυρενικό τρυβλίο 96 βοθρίων και το προϊόν της αντίδρασης φωτομετρείται, σε φωτόμετρο ELISA, στα 750 nm ως προς το λευκό δείγμα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg ισοδυνάμων γαλλικού οξέος (gallic acid equivalents, GAE), χρησιμοποιώντας πρότυπη καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος.

Πρότυπη καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης παρασκευάζονται διαλύματα γαλλικού οξέος (GA) σε συγκεντρώσεις 25, 50, 100, 200, 400, 600 και 800 μg/mL από μητρικό διάλυμα γαλλικού οξέος συγκέντρωσης 1 mg/mL σε μεθανόλη. 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 x αποδίδονται οι τιμές της απορρόφησης στα 750 nm και στον άξονα των y αποδίδονται οι τιμές ποσοτήτων του γαλλικού οξέος σε mg.

2.4.2 Προσδιορισμός Ολικών Φλαβανολών

Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Ρυθμιζόμενες πιπέττες (100-1000 μL), με τα αντίστοιχα tips
Φιαλίδια eppendorf, χωρητικότητας 1.5 mL
Πολυστυρενικά τρυβλία 96 βοθρίων
Μεθανόλη (MeOH) αναλυτικής καθαρότητας
Οξικό οξύ (Acetic acid, AcOH 5 % σε MeOH)
Τριχλωριούχος άργιλος ($AlCl_3$, 2 % σε 5 % AcOH σε MeOH)
Ρουτίνη (Rutin, R)

Όργανα

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων
Κυκλοαναδευτήρας Vortex
Φωτόμετρο ELISA (ELISA reader) SUNRISE TECAN

Αναλυτική πορεία

Ο προσδιορισμός των ολικών φλαβανολών έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλό των Arnous *et al.* (2002). Η διαδικασία που περιγράφεται είναι κοινή για όλα τα βότανα της μελέτης. Αρχικά, γίνεται διαλυτοποίηση του αφυδατωμένου αφεψήματος σε MeOH ώστε η συγκέντρωση του δείγματος να είναι 2 mg/mL. Στη συνέχεια, 500 μL δείγματος ή 500 μL καθαρής MeOH για το λευκό προσδιορισμό, μεταφέρονται σε φιαλίδιο eppendorf το οποίο περιέχει 50 μL $AlCl_3$ και 500 μL CH_3COOH. Το μίγμα αναδεύεται ισχυρά και επωάζεται για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την πάροδο των 30 min, μεταφέρονται με ρυθμιζόμενη πιπέττα 200 μL του μίγματος σε πολυστυρενικό τρυβλίο 96 βοθρίων και το προϊόν της αντίδρασης φωτομετρείται, σε φωτόμετρο ELISA, στα 415 nm ως προς το λευκό δείγμα. Η έκφραση των αποτελεσμάτων γίνεται σε mg ισοδυνάμων ρουτίνης (rutin equivalents, RE), χρησιμοποιώντας πρότυπη καμπύλη αναφοράς ρουτίνης.

Πρότυπη καμπύλη αναφοράς ρουτίνης

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης παρασκευάζονται διαλύματα ρουτίνης σε συγκεντρώσεις 1, 2, 4, 6, 8 και 10 mg/mL από μητρικό διάλυμα ρουτίνης συγκέντρωσης 20 mg/mL σε μεθανόλη. 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 x αποδίδονται οι τιμές της απορρόφησης στα 415 nm και στον άξονα των y αποδίδονται οι ποσότητες ρουτίνης σε mg.

2.4.3 Ποιοτικός και Ποσοτικός Προσδιορισμός Απλών Πολυφαινολών και Τερπενικών Οξέων με Αέρια Χρωματογραφία Συζευγμένη με Φασματομετρία Μάζας (Gas Chromatography- Mass Spectrometry, GC-MS)

Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέττες (10-1000 μL), με τα αντίστοιχα tips
Φιαλίδια eppendorf, χωρητικότητας 1.5 mL
Σφραγιζόμενα φιαλίδια GC (GC vials), χωρητικότητας 1.5 mL
Πώματα για φιαλίδια GC
Μεθανόλη (MeOH) αναλυτικής καθαρότητας
3-(4-υδρόξυ-φαινυλ)-1-προπανόλη, 3-(4-hydroxy-phenyl)-1-propanol (εσωτερικό πρότυπο)
BSTFA (N,O- Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide, N, O- δις(τριμεθυλσίλυλ)-τριφθοροακεταμίδιο)
Ήλιο (He) υψηλής καθαρότητας (99.999 %)

Όργανα

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων
Κυκλοαναδευτήρας Vortex
Φυγοκεντρικός εξατμιστήρας (Speedvac)
Υδατόλουτρο
Συσκευή αέριας χρωματογραφίας HP Series 6890 N
Ανιχνευτής μάζας HP 5973MS (EI ηλεκτρονιακού ιονισμού 70 eV)
Αυτόματος δειγματολήπτης HP 7683
Τριχοειδής στήλη HP-5 MS (5- φαινυλο-95 % μεθυλοσιλοξάνιο, μήκους 30 m, διαμέτρου 0.25 mm, πάχους εσωτερικής επίστρωσης 0.25 μm)

Αρχή μεθόδου

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

την έξοδο τους από τη χρωματογραφική στήλη, τα συστατικά εισέρχονται στο φασματογράφο μάζας όπου και «βομβαρδίζονται» από ελεύθερα ηλεκτρόνια, τα οποία εκπέμπονται από ένα νήμα (filament), με επιτάχυνση 70 eV. Τα μόρια, τα οποία εισέρχονται κάθετα προς τη δέσμη των ηλεκτρονίων, δημιουργούν χαρακτηριστικά και αναπαραγώγιμα θραύσματα- ιόντα. Τα θετικά ιόντα μετακινούνται στον αναλυτή μάζας λόγω της παρουσίας απωθούντος ηλεκτροδίου (repeller). Το ιόν-«στόχος» (target ion), στο οποίο και βασίζεται ο ποσοτικός προσδιορισμός, συμβολίζεται με Τ ενώ τα ιόντα που παρακολουθούνται και καταγράφονται για την επιβεβαίωση της παρουσίας κάθε συστατικού στο δείγμα (qualifier ions) συμβολίζονται με Q1 και Q2

Αναλυτική πορεία

Η διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω είναι κοινή για τα δεκατρία βότανα της μελέτης. Αρχικά, σε φιαλίδιο αέριας χρωματογραφίας (GC vial) ζυγίζονται 2 $\pm$ 0.5 mg αφυδατωμένου αφεψήματος και ακολουθεί προσθήκη 50 μL εσωτερικού προτύπου (Internal Standard, IS, 2 mg/L 3-(4-υδρόξυ-φαινυλ)-1-προπανόλη σε MeOH). Στη συνέχεια, απομακρύνεται ο διαλύτης σε φυγοκεντρικό εξατμιστήρα (Speedvac) και προστίθενται 250 μL αντιδραστηρίου σιλυλίωσης (BSTFA) ούτως ώστε οι πολυφαινόλες να μετατραπούν σε πτητικούς τριμεθυλ-σιλυλιωμένους αιθέρες τους (TMS). Τα φιαλίδια σφραγίζονται και η αντίδραση σιλυλίωσης λαμβάνει χώρα έπειτα από επώαση του δείγματος για 20 min σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 70 °C (Soleas *et al.*, 1997). Τα προϊόντα της προαναφερθείσας διαδικασίας αναλύονται σε συσκευή GC-MS, υπό τις ακόλουθες συνθήκες: ο εισαγωγέας τέθηκε στους 250 °C, η γραμμή μεταφοράς του δείγματος από την χρωματογραφική στήλη στον ανιχνευτή μάζας (MSD transfer line) στους 300 °C, η ροή He ήταν 0,6 mL/min ενώ η εισαγωγή του δείγματος (1 μL) πραγματοποιήθηκε σε λειτουργία split (split ratio 20:1), οπου το το 1/20 του δείγματος εισέρχεται στη στήλη και τα 19/20 πομακρύνονται στην ατμόσφαιρα. Για την ανάλυση εφαρμόσθηκε στο φούρνο του οργάνου το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2 Θερμοκρασιακό πρόγραμμα για τον προσδιορισμό απλών πολυφαινολών, τερπενικών οξέων και φαινολών με τη μέθοδο GC-MS

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

Για το προσδιορισμό 27 φαινολικών συστατικών και 2 τερπενικών οξέων για τα οποία υπήρχαν πρότυπες ουσίες εφαρμόσθηκε η μέθοδος επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (Selective Ion Monitoring, SIM) GC-MS. Ο προσδιορισμός της θυμόλης και της καρβακρόλης βασίστηκε στην εφαρμογή της μεθόδου συνολικής παρακολούθησης ιόντων-θραυσμάτων (μέθοδος full scan). Ο ποιοτικός 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 (Kalogeropoulos *et al.*, 2009), ενώ ο ποσοτικός προσδιορισμός βασίστηκε στη χρήση του IS και στην κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς για κάθε μια από τις πρότυπες ουσίες που αναλύθηκαν. Η ένωση που χρησιμοποιήθηκε ως IS δεν περιέχεται στα υπό ανάλυση δείγματα ενώ η κορυφή της είναι ευδιάκριτη και διαχωρίζεται από τα άλλα συστατικά. Η ποσοτικοποίηση με εσωτερικό πρότυπο γίνεται βάσει καμπυλών αναφοράς από σειρά 9 πρότυπων μιγμάτων των φαινολικών και τερπενικών συστατικών, που περιέχουν την ίδια ποσότητα εσωτερικού προτύπου με τα δείγματα.. Στον Πίνακα 2.3 παρουσιάζονται οι πρότυπες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν και τα αντίστοιχα ιόντα T, Q1, Q2 αυτών, ενώ στο Παράρτημα Ι παρουσιάζονται οι συνακτικοί τύποι των ενώσεων.

Πίνακας 2.3 Ιόν-«στόχος» και ιόντα επιβεβαίωσης για τους TMS 27 πολυφαινολών, 2 τερπενικών οξέων, 2 τερπενοειδών φαινολών και του εσωτερικού προτύπου (IS)

Α/Α	Συστατικό	Κατηγορία	Ιόν- «στόχος» Target ion (m/z)	Ιόντα επιβεβαίωσης Qualifier ions (m/z)
1	βανιλίνη	φαινόλη	194	209
2	κινναμωμικό οξυ	φαινόλη	205	220
3	τυροσόλη	φαινόλη	179	267, 282
4	υδροξυ- τυροσόλη	φαινόλη	209	267, 311
5	*p*-υδροξυ- βενζοϊκό οξυ	φαινόλη	267	223, 193
6	*p*- υδροξυ- φαινυλοξικό οξυ	φαινόλη	252	296, 281
7	3-(4-υδροξυφαινυλ)-1-προπανόλη	εσωτερικό πρότυπο	206	191, 179
8	φλωρετικό οξύ	φαινόλη	192	310
9	βανιλικό οξύ	φαινόλη	297	267, 312
10	ομοβανιλική αλκοόλη	φαινόλη	326	267, 311
11	πρωτοκατεχικό οξυ	φαινόλη	193	355, 370
12	3-4 διυδροξυφαινυλοξικό οξύ	φαινόλη	384	267, 179
13	συριγγικό οξυ	φαινόλη	327	342, 312
14	*o*-κουμαρικό οξυ	φαινόλη	293	308, 147
15	*p*- κουμαρικό οξυ	φαινόλη	308	293, 219

Α/Α	Συστατικό	Κατηγορία	Ιόν- «στόχος» Target ion (m/z)	Ιόντα επιβεβαίωσης Qualifier ions (m/z)
16	γαλλικό οξύ	φαινόλη	281	458, 443
17	φερουλικό οξύ	φαινόλη	338	323, 308
18	καφεϊκό οξύ	φαινόλη	396	219, 381
19	σιναπικό οξύ	φαινόλη	368	353, 338
20	χρυσίνη	φαινόλη	383	355, 474
21	επικατεχίνη	φαινόλη	368	355, 474
22	ναριγκενίνη	φαινόλη	473	296
23	κατεχίνη	φαινόλη	368	355, 474
24	γενιστεϊνη	φαινόλη	473	
25	καμπφερόλη	φαινόλη	559	560
26	χλωρογενικό οξυ	φαινόλη	345	307, 324
27	ροσμαρινικό οξύ	φαινόλη	396	397,398
28	κερκετίνη	φαινόλη	647	559, 575
29	θυμόλη	τερπενοειδής φαινόλη	207	222, 165
30	καρβακρόλη	τερπενοειδής φαινόλη	207	222, 165
31	ολεανολικό οξύ	τερπενικό οξύ	203	320, 482
32	ουρσολικό οξύ	τερπενικό οξύ	203	320, 482

2.4.4 Ποιοτικός Προσδιορισμός Φαινολικών Συστατικών με τη Μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Συζευγμένης με Φασματομετρία/ Φασματοσκοπία Μάζας (Liquid Chromatography- Mass Spectrometry, LC- DAD- MS)

<u>Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα</u>

Αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέττες (100-1000 μL), με τα αντίστοιχα tips

Φιαλίδια eppendorf, χωρητικότητας 1.5 mL

Φιαλίδια LC (LC vials), χωρητικότητας 1.5 mL

Φίλτρα με πόρους διαμέτρου 0.45 μm

Σύριγγες, χωρητικότητας 5 mL

Μεθανόλη (MeOH) καθαρότητας LC

Νερό (H_2O) καθαρότητας LC

Οξικό οξύ (Acetic acid, AcOH) καθαρότητας LC

<u>Όργανα</u>

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων

Κυκλοαναδευτήρας Vortex

Αντλία χρωματογράφου, Finnigan MAT Spectra System P 4000

Ανιχνευτής υπεριώδους συστοιχίας διόδων, Finnigan SpectraSystem UV 6000 LP

Φασματογράφος μαζών, Finnigan AQA

Στήλη Superspher της Phenomenex, 100- 4 (RP-18), 125 × 2.0 mm, 4 μm

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος της υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματοσκοπία μαζών ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό και ανιχνευτή ορατού υπεριώδους συστοιχίας διόδων αποτελεί μια υψηλής πιστότητας και ιδιαίτερα αποτελεσματική μέθοδο για την ταυτοποίηση μη πτητικών ουσιών που υπάρχουν σε ένα μίγμα. Ο διαχωρισμός των διαφόρων συστατικών του μίγματος επιτυγχάνεται λόγω των διαφορετικών δυνάμεων συγκράτησης και έκλουσης μεταξύ των συστατικών του δείγματος, του υλικού πληρώσεως της στήλης και της ροής του φέροντος διαλύτη. Τα συστατικά εξέρχονται 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

Η διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω είναι κοινή για τα δεκατρία βότανα της μελέτης. Αρχικά, σε φιαλίδιο eppendorf ζυγίζονται 2 ± 0.5 mg του αφυδατωμένου δείγματος του αφεψήματος και ακολουθεί διαλυτοποίησή του σε MeOH. Στη συνέχεια, λαμβάνεται το διαλυτοποιημένο δείγμα με τη χρήση σύριγγας και μεταφέρεται σε φιαλίδιο LC αφού διέλθει από φίλτρο με διάμετρο πόρων 0.45 μm. Τα συστατικά του αναλύονται με τη διάταξη LC-DAD-MS, η οποία αποτελείται από την αντλία χρωματογραφίας, τον ανιχνευτή διόδων και το φασματογράφο μαζών. Η θερμοκρασία της στήλης παρέμεινε σταθερή στους 40 °C και η ροή της κινητής φάσης του συστήματος ήταν 0.3 mL/min. Στον Πίνακα 2.4 παρουσιάζεται το αναλυτικό πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης. Οι απορροφήσεις των εκλουόμενων συστατικών καταγράφονται στα 278 και 340 nm.

Πίνακας 2.4 Πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης των φαινολικών συστατικών

t (min)	H_2O (2.5 % AcOH)	MeOH
0	100	0
2	100	0
52	0	100
62	0	100
65	100	0

Για τη φασματοσκοπία μαζών, ο ηλεκτροψεκασμός (ESI^+) πραγματοποιείται στους 400 °C και 4,0 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}.

2.4.5 Ποιοτικός Προσδιορισμός Πτητικών Συστατικών με τη Μέθοδο GC-MS

Υαλικά-Αναλώσιμα

Ογκομετρική φιάλη, χωρητικότητας 100 mL
Εκχυλιστική χοάνη, χωρητικότητας 250 mL
Σφαιρική φιάλη, χωρητικότητας 100 mL
Σφραγιζόμενα φιαλίδια GC (GC vials), χωρητικότητας 1.5 mL
Πώματα για φιαλίδια GC
Διαιθυλαιθέρας (Diethyl ether) αναλυτικής καθαρότητας
Αέριο άζωτο (N_2) υψηλής καθαρότητας (99.999 %)
Ήλιο (He) υψηλής καθαρότητας (99.999 %)

Όργανα

Περιστροφικός συμπυκνωτής κενού
Συσκευή αέριας χρωματογραφίας HP Series 6890 N
Ανιχνευτής μάζας HP 5973MS (EI ηλεκτρονιακού ιονισμού 70 eV)
Αυτόματος δειγματολήπτης HP 7683
Τριχοειδής στήλη HP-5 MS (5- φαινυλο-95 % μεθυλοσιλοξάνιο, 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)

Αναλυτική πορεία

Η διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω είναι κοινή για τα δεκατρία βότανα της μελέτης. Αρχικά, με τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2, παρασκευάζεται το αφέψημα.

Ακολούθως, με τη χρήση ογκομετρικής φιάλης λαμβάνονται 100 mL αφεψήματος και μεταφέρονται σε εκχυλιστική χοάνη. Η εκχύλιση και παραλαβή των πτητικών συστατικών που υπάρχουν στο αφέψημα πραγματοποιείται με οργανικό διαλύτη. Αναλυτικότερα, στην εκχυλιστική χοάνη προστίθενται 35 mL διαιθυλαιθέρα και το μίγμα αναταράσσεται ισχυρά. Μετά το διαχωρισμό των δυο φάσεων, η οργανική φάση συλλέγεται σε σφαιρική φιάλη, ενώ η υδατική φάση εκχυλίζεται και άλλες δυο φορές με το διαλύτη. Οι οργανικές φάσεις ενώνονται και συμπυκνώνονται σε περιστροφικό συμπυκνωτή κενού μέχρι τελικού όγκου 1.5 mL και μεταφέρονται σε φιαλίδια GC, όπου γίνεται περαιτέρω συμπύκνωση σε ρεύμα αζώτου μέχρι τελικού όγκου 0.5 mL.

Η ανάλυση των εκχυλισμάτων πραγματοποιείται σε αέριο χρωματογράφο, όπως περιγράφεται στην παράγραφό 2.4.3 παρακολουθώντας το σύνολο των ιόντων-θραυσμάτων των συστατικών τους (μέθοδος full scan). Οι συνθήκες ανάλυσης ήταν: ο εισαγωγέας τέθηκε στους 220 °C, η γραμμή μεταφοράς του δείγματος από την αέριοχρωματογραφική στήλη στον ανιχνευτή μάζας (MSD transfer line) στους 300 °C, η ροή He ήταν 1 mL/min ενώ η εισαγωγή του δείγματος (1 μL) έγινε χωρίς σχάση, δηλαδή όλο το δείγμα εισήχθη στην χρωματογραφική στήλη (splitless injection). Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα του φούρνου του αέριου χρωματογράφου που εφαρμόστηκε για το διαχωρισμό παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.5.

Πίνακας 2.5 Θερμοκρασιακό πρόγραμμα για τον προσδιορισμό πτητικών συστατικών

Στάδιο ανάλυση	Θερμοκρασία φούρνου
Αρχική	40 °C για 0 min
1η άνοδος	3 °C/min μέχρι 220 °C για 0 min
2η άνοδος	18 °C/min μέχρι 320 °C για 4 min
Τελική	0 °C

Η ταυτοποίηση των ενώσεων που ανιχνεύονται στηρίζεται στη σύγκριση του φάσματος μαζών τους με αντίστοιχα ενώσεων που έχουν καταχωρηθεί σε ηλεκτρονικές βιβλιοθήκες φασμάτων μαζών. Οι βιβλιοθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων είναι οι NIST 98 και Wiley 275.

2.5 Μελέτη της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας των Αφεψημάτων

2.5.1 Εκτίμηση της Ικανότητας Δέσμευσης Ελευθέρων Ριζών Μέσω της Δέσμευσης της 1, 1- Διφαινυλο-2- Πικρυλο-Υδραζυλο Ελεύθερης Ρίζας (DPPH•)

Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέττες (10-1000 μL), με τα αντίστοιχα tips
Φιαλίδια eppendorf, χωρητικότητας 1.5 mL
Πολυστυρενικά τρυβλία 96 βοθρίων
Μεθανόλη (MeOH) αναλυτικής καθαρότητας
DPPH• (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, 1, 1- διφαινυλο-2- πικρυλο-υδραζύλο ελεύθερη ρίζα)
Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, 6-υδροξυ-2,5,7,8-τετραμεθυλχρωμαν-2- καρβοξυλικό οξύ)

Όργανα

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων
Κυκλοαναδευτήρας Vortex
Φωτόμετρο ELISA (ELISA reader) SUNRISE TECAN

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος αυτή βρίσκει εφαρμογή στην ανίχνευση αντιοξειδωτικών ουσιών σε διαλύματα. Συγκεκριμένα, βασίζεται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών ουσιών να δεσμεύουν τη σταθερή ελεύθερη ρίζα DPPH•. Το διάλυμα της DPPH•, όταν αυτή βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή έχει χαρακτηριστικό ιώδες χρώμα που απορροφά στα 515 nm, ενώ η δέσμευσή της οδηγεί στον αποχρωματισμό του διαλύματος.

Αναλυτική πορεία

Η εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH• από τα αφεψήματα που μελετήθηκαν έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Arnous *et al.* (2002). Αρχικά σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας ζυγίζεται ποσότητα στερεού υπολείμματος των αφεψημάτων και διαλυτοποιείται σε κατάλληλο όγκο μεθανόλης ώστε η συγκέντρωση των δειγμάτων να είναι 4 mg/mL. Στη συνέχεια, σε φιαλίδια eppendorf που περιέχουν 975 μL διαλύματος DPPH• (0.1 mM σε MeOH) προστίθενται 25 μL δείγματος. Το μίγμα αναδεύεται ισχυρά σε vortex και με τη χρήση

ρυθμιζόμενης πιπέττας, 200 μL του μίγματος μεταφέρονται σε πολυστυρενικό τρυβλίο 96 βοθρίων και φωτομετρούνται, σε φωτόμετρο ELISA, στα 515 nm, ($t = 0$ min, A_0515). Το μίγμα φυλάσσεται σε σκοτεινό μέρος, για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την πάροδο των 30 min, η διαδικασία επαναλαμβάνεται και το προϊόν της αντίδρασης φωτομετρείται, επίσης, στα 515 nm ($t = 30$ min, $A_{30}515$). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg ισοδυνάμων Trolox (Trolox equivalents, TE), που είναι υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης Ε, χρησιμοποιώντας πρότυπη καμπύλη αναφοράς Trolox.

<u>Πρότυπη καμπύλη αναφοράς Trolox</u>

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης παρασκευάζονται διαλύματα Trolox σε συγκεντρώσεις 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.4 και 1.6 mM από μητρικό διάλυμα Trolox συγκέντρωσης 2 mM σε μεθανόλη. 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 x αποδίδονται οι τιμές της % ΔA_{515} και στον άξονα των y αποδίδονται οι διαφορετικές τιμές ποσοτήτων Trolox σε mg.

Όπου:

$$\% \, \Delta A515 = [\,(A_0515 - A_{30}515)/\,A_0515] \times 100$$

2.5.2 Εκτίμηση της Αναγωγικής Ικανότητας Μέσω Αναγωγής του Fe^{3+} σε Fe^{2+} (FRAP)

<u>Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα</u>

Αυτόματες επαναλαμβανόμενες πιπέττες (10-1000 μL), με τα αντίστοιχα tips
Φιαλίδια eppendorf, χωρητικότητας 1.5 mL
Πολυστυρενικά τρυβλία 96 βοθρίων
Μεθανόλη (MeOH) αναλυτικής καθαρότητας
Υδροχλώρικό οξύ (HCl, 12 N)
Τριχλωριούχος σίδηρος ($FeCl_3$, 3 mM σε 5 mM HCl)
TPTZ (2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine, 2, 4, 6- τριπυριδυλο-s-τριαζίνη, 1 mM σε 0.05 M HCl)
Απιονισμένο νερό
Ασκορβικό οξύ (Ascorbic acid, AA)

<u>Όργανα</u>

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων

Κυκλοαναδευτήρας Vortex

Υδατόλουτρο

Φωτόμετρο ELISA (ELISA reader) SUNRISE TECAN

Αρχή μεθόδου

Η δοκιμή FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) μετρά την αντιοξειδωτική ικανότητα των συστατικών ενός δείγματος μέσω της μέτρησης της αναγωγικής τους δύναμης. Συγκεκριμένα, η δοκιμή FRAP βασίζεται στη δυνατότητα των συστατικών του δείγματος να ανάγουν το σύμπλοκο TPTZ-Fe (III) σε έγχρωμο (μπλε) σύμπλοκο TPTZ-Fe (II), το οποίο απορροφά στα 620 nm.

Αναλυτική πορεία

Αρχικά σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας ζυγίζεται ποσότητα στερεού υπολείμματος των αφεψημάτων και διαλυτοποιείται σε κατάλληλο όγκο μεθανόλης, ώστε η συγκέντρωση των δειγμάτων να είναι 2 mg/mL. Τα διαλύματα των αφεψημάτων αραιώνονται περαιτέρω σε MeOH, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.6. Στη συνέχεια, σε φιαλίδιο eppendorf προστίθενται 50 μL αραιωμένου δείγματος και 50 μL $FeCl_3$ ή απιονισμένου νερού, για την παρασκευή του λευκού δείγματος. Το μίγμα αναδεύεται ισχυρά και επωάζεται για 30 min σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 37 °C. Ακολούθως, προστίθενται 900 μL διαλύματος TPTZ, το μίγμα αναταράσσεται σε αναδευτήρα vortex και επωάζεται για 10 min, σε συνθήκες σκότους (Arnous *et al.*, 2002). Μετά την πάροδο των 10 min, με τη χρήση ρυθμιζόμενης πιπέττας, 200 μL του μίγματος μεταφέρονται σε πολυστυρενικό τρυβλίο 96 βοθρίων και το προϊόν της αντίδρασης φωτομετρείται σε φωτόμετρο ELISA, στα 620 nm ως προς το λευκό δείγμα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg ισοδυνάμων ασκορβικού οξέος (ascorbic acid equivalents, AAE), χρησιμοποιώντας πρότυπη καμπύλη αναφοράς ασκορβικού οξέος.

Πίνακας 2.6 Συγκεντρώσεις διαλυμάτων «εργασίας» των αφεψημάτων για την εκτέλεση του προσδιορισμού FRAP

Α/Α	Βότανο	Αρχική συγκέντρωση (mg/mL)	Αραίωση (v/v)
1	Αντωναΐδα	2	1:2
2	Δενδρολίβανο	2	1:2
3	Δίκταμο	2	1:4
4	Θρύμπα	2	1:2
5	Θυμάρι	2	1:2
6	Μαντζουράνα	2	1:2
7	Μελισσόχορτο	2	1:4
8	Ρίγανη	2	1:4

Α/Α	Βότανο	Αρχική συγκέντρωση (mg/mL)	Αραίωση (v/v)
9	Σπαθόχορτο	2	1:4
10	Τσάι βουνού	2	1:2
11	Φασκόμηλο	2	1:2
12	Φλισκούνι	2	1:2
13	Χαμομήλι	2	1:2

Πρότυπη καμπύλη αναφοράς ασκορβικού οξέος

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης παρασκευάζονται διαλύματα ασκορβικού οξέος συγκεντρώσεων 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 και 0.5 mM από μητρικό διάλυμα ασκορβικού οξέος συγκέντρωσης 1 mM σε μεθανόλη. 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 x αποδίδονται οι τιμές της απορρόφησης στα 620 nm και στον άξονα των y αποδίδονται οι διαφορετικές τιμές ποσοτήτων ασκορβικού οξέος σε mg.

2.5.3 Εκτίμηση της Ικανότητας Δημιουργίας Χηλικών Συμπλόκων με Ιόντα Fe^{2+} με τη Χρήση Φεροζίνης

Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέττες (10-1000 μL), με τα αντίστοιχα tips
Φιαλίδια eppendorf, χωρητικότητας 1.5 mL
Πολυστυρενικά τρυβλία 96 βοθρίων
Φεροζίνη (benzenesulfonate, 4,4'-[3-(2-pyridinyl)-1,2,4-triazine-5,6-diyl]bis- hydrogen sodium salt, 4-[3-(2-πυριδινυλ)-6-(4-σουλφονυλφαινυλ)-1, 2, 4-τριαζινο-5-υλ] βενζολοσουλφονικό νάτριο)
Ένυδρος χλωριούχος σίδηρος ($FeCl_2 \times 4H_2O$)
Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)
Απιονισμένο νερό

Όργανα

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων
Κυκλοαναδευτήρας Vortex
Φωτόμετρο ELISA (ELISA reader) SUNRISE TECAN

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών ουσιών να δεσμεύουν ιόντα μετάλλων, δημιουργώντας σταθερά χηλικά σύμπλοκα με αυτά. Συγκεκριμένα, η δοκιμή με τη χρήση φεροζίνης βασίζεται στη δυνατότητα των συστατικών του δείγματος να δεσμεύουν το Fe^{++}, δημιουργώντας σταθερά άχρωμα σύμπλοκα, ενώ η παρουσία συμπλόκων φεροζίνης-Fe αποδίδει στο διάλυμα μπλε απόχρωση, η απορρόφηση του οποίου εκτιμάται στα 562 nm.

Αναλυτική πορεία

Η εκτίμηση της ικανότητας των αφεψημάτων να δημιουργούν χηλικά σύμπλοκα με ιόντα σιδήρου έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Heimler *et al.* (2007) με μικρές τροποποιήσεις. Αρχικά σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας ζυγίζονται ποσότητες στερεού υπολείμματος των αφεψημάτων και διαλυτοποιούνται σε κατάλληλο όγκο απιονισμένου νερού, ώστε οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων να είναι 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 20 και 25 mg/mL. Στη συνέχεια, σε φιαλίδιο eppendorf προστίθενται 50 μL δείγματος ή απιονισμένου νερού για το λευκό προσδιορισμό, 750 μL απιονισμένου νερού και 12.5 μL $FeCl_2$ (2 mM). Για τη διόρθωση των αποτελεσμάτων ως προς τον υπάρχων στα αφεψήματα σίδηρο σε φιαλίδιο eppendorf προστίθενται 50 μL δείγματος και 762.5 μL απιονισμένου νερού και ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφεται στη συνέχεια. Το μίγμα αναδεύεται ισχυρά και επωάζεται για 10 min σε σκοτεινό μέρος. Ακολούθως, προστίθενται 50 μL διαλύματος φεροζίνης (5 mM), το μίγμα αναταράσσεται εκ νέου σε αναδευτήρα vortex και επωάζεται για 5 min, σε συνθήκες σκότους. Μετά την πάροδο των 5 min, με τη χρήση ρυθμιζόμενης πιπέττας, 200 μL του μίγματος μεταφέρονται σε πολυστυρενικό τρυβλίο 96 βοθρίων και το προϊόν της αντίδρασης φωτομετρείται, σε φωτόμετρο ELISA, στα 562 nm ως προς το λευκό δείγμα. Η % ικανότητα δέσμευσης των ιόντων Fe^{++} υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο.

$$\textit{Συμπλεκτική ικανότητα}\ \% = \left[\frac{A_0 - A_s}{A_0}\right] \times 100$$

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.

2.5.4 Εκτίμηση της Ικανότητα Δημιουργίας Χηλικών Συμπλόκων με Κατιόντα Cu^{+2} με τη Μέθοδο της Διαφορικής Παλμικής Ανοδικής Αναδιαλυτικής Βολταμετρίας (Differential Pulse Anodic Stripping Voltametry, DPASV)

Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέττες (10-1000 μL), με τα αντίστοιχα tips
Δοχεία teflon με πώμα
Ογκομετρικές φιάλες, χωρητικότητας 100 mL
Χλωριούχο νάτριο (NaCl, 3M)
Υδροχλώρικό οξύ (HCl, 12 N)
Νιτρικός χαλκός ($Cu(NO_3)_2$)
Δις απιονισμένο νερό

Όργανα

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων
Λυχνία υπεριώδους ακτινοβολίας (ultraviolet, UV)
Ψύκτης (2-4 °C)
Σύστημα διασύνδεσης (interface) με μικροεπεξεργαστή
Σύστημα μέτρησης (measuring stand), το οποίο περιλαμβάνει:

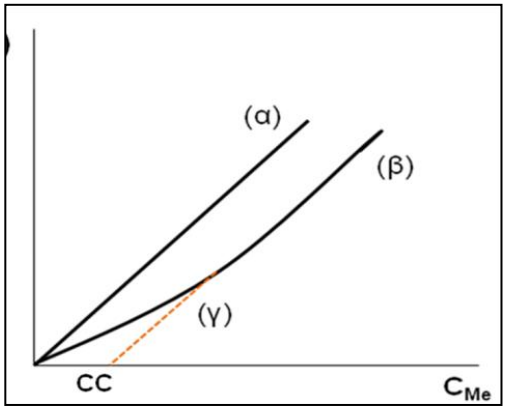
1. ποτενσιοστάτη
2. ενισχυτή μέτρησης ρεύματος για την καταγραφή της έντασης του ρεύματος
3. αναλογικό- ψηφιακό μετατροπέα
4. ψηφιακό- αναλογικό μετατροπέα
5. ρυθμιστές βαλβίδων αερίων
6. κυψελίδα μέτρησης τριών ηλεκτροδίων (εργασίας, υδραργύρου (Hg)- αναφοράς, αργύρου (Ag)/ χλωριούχου αργύρου (AgCl)- βοηθητικό) με αναδευτήρα

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος αυτή προσδιορισμού ορισμένων μετάλλων, όπως ο χαλκός (Cu), βασίζεται είτε στην ικανότητα τους να είναι διαλυτά στον υδράργυρο με σχηματισμό αμαλγαμάτων είτε στην ικανότητά τους να αποτίθενται ηλεκτρολυτικά σε ηλεκτρόδια άνθρακα ή ευγενών μετάλλων (Lazar *et al.*, 1981). Στην πρώτη φάση (φάση συσσώρευσης) ο αναλυτής αποτίθεται στο ηλεκτρόδιο εργασίας σε σταθερό δυναμικό και με το διάλυμα υπό συνεχή ανάδευση. Μεγίστης σημασίας, είναι ο αυστηρός έλεγχος των συνθηκών εργασίας, προκειμένου να επιτυγχάνονται

αναπαραγώγιμες/ επαναλήψιμες μετρήσεις (χρόνος απόθεσης, δυναμικό απόθεσης, σχήμα, μέγεθος και διάταξη αναδευτήρα, ταχύτητα περιστροφής, όγκος δείγματος, επιφάνεια ηλεκτροδίου). Στη δεύτερη φάση, παύει η ανάδευση του διαλύματος, το οποίο παραμένει σε ηρεμία, οπότε το καθοδικό ρεύμα μειώνεται 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 βολταμογράφημα, 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 ASV ο προσδιορισμός βασίζεται στην ανοδική αναδιάλυση του συσσωρευμένου αναλυτή. Η διαδικασία αυτή ακολουθείται βολταμετρικά και παράγει μια κορυφή ρεύματος η οποία είναι ανάλογη του ρυθμού σάρωσης του δυναμικού και της ακτίνας της σταγόνας Hg.



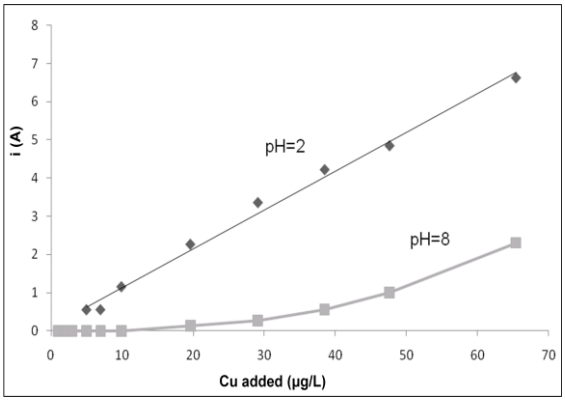
Διάγραμμα 2.1 Διάγραμμα διαφορικής παλμικής πολαρογραφίας, προσθήκης γνωστής ποσότητας μετάλλου (CMe). Η *καμπύλη α* αντιστοιχεί σε μηδενική συγκέντρωση υποκαταστατών (L= 0), η *καμπύλη β* σε μη μηδενική συγκέντρωση υποκαταστατών (L≠ 0) και το *τμήμα γ* στην προέκταση του παράλληλου με την *ευθεία α*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

<u>Αναλυτική πορεία</u>

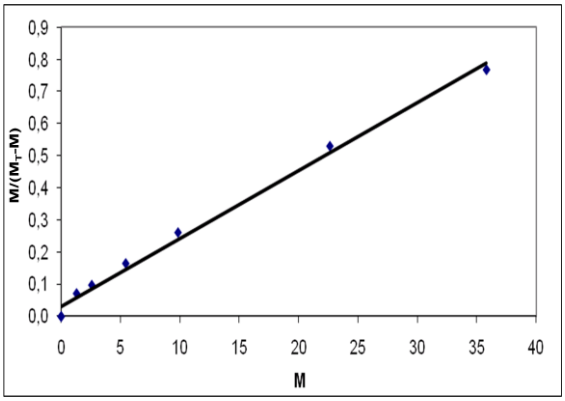
Σε πρώτο στάδιο γίνεται η παρασκευή του διαλύματος χαλκού σε πλαστικό δοχείο των 100mL. Ακολούθως, σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας ζυγίζονται 15 mg στερεού υπολείμματος των αφεψημάτων και διαλυτοποιούνται σε δις απιονισμένο νερό σε τελικό όγκο διαλύματος 100 mL (συγκέντρωση δειγμάτων 150 mg/L). Τα διαλυτοποιημένα δείγματα αποθηκεύονται στους 2 ℃. Εν συνεχεία, 40 mL δείγματος μεταφέρονται σε κυψελίδα μέτρησης τριών ηλεκτροδίων αφού

προηγηθεί η προσθήκη 10 σταγόνων NaCl. Η συμπλεκτική ικανότητα των συστατικών του δείγματος προσδιορίζεται μετά από διαδοχική προσθήκη διαλύματος χαλκού γνωστού όγκου στο υπό εξέταση δείγμα. Παράλληλα προσδιορίζεται η ποσότητα του μετάλλου σε μηδενική συγκέντρωση υποκαταστατών. Για το σκοπό αυτό, 40 mL δείγματος μεταφέρονται σε δοχείο Teflon και το διάλυμα ακτινοβολείται με UV ακτινοβολία για 12 h αφού προηγηθεί η ρύθμιση του pH του διαλύματος (pH= 2) με την προσθήκη HCl. Με την ακτινοβόληση καταστρέφεται ολοσχερώς η οργανική ύλη του δείγματος.

Ο προσδιορισμός της συμπλεκτικής ικανότητας μετάλλου (CCCu) σε αδρανή συστήματα βασίζεται σε διαγράμματα (Διάγραμμα 2.1) (Davison, 1978), 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 $καμπύλης\ \beta$ στον άξονα των τετμημένων ($ευθεία\ \gamma$). 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 y) ως προς M (άξονας x) 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 ($τεταγμένη\ =1/K\ LT$), ενώ από την κλίση της ευθείας ($κλίση\ =1/LT$) προσδιορίζεται η συμπλεκτική ικανότητα των ιόντων χαλκού (LT) (Διαγράμματα 2.2 και 2.3).



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



Διάγραμμα 2.3 Διάγραμμα Ruzic. Ευθεία καμπύλη του λόγου $\boldsymbol{M/(MT-M)}$ (του ελεύθερου ιοντικού χαλκού προς το συμπλεγμένο) ως προς $\boldsymbol{M}$.

2.5.5 Αναστολή της In Vitro Οξειδωτικής Τροποποίησης των Λιποπρωτεϊνών του Ορού από $CuSO_4$

Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέττες (10-1000 μL), με τα αντίστοιχα tips
Αποστειρωμένες σύριγγες, χωρητικότητας 5 mL
Δοκιμαστικοί σωλήνες (falcon tubes), χωρητικότητας 15 mL
Φιαλίδια eppendorf, χωρητικότητας 1.5 mL
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate-buffered saline, PBS)
Ένυδρος θειικός χαλκός ($CuSO_4 \times 5H_2O$)
Πολυστυρενικά τρυβλία 96 βοθρίων, κατάλληλα για υπεριώδη (ultraviolet, UV) ακτινοβολία
Απιονισμένο νερό

Όργανα

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων
Κυκλοαναδευτήρας Vortex
Ψυχόμενη φυγόκεντρος (eppendorf centrifuge 5810 R)
Φωτόμετρο ELISA (ELISA reader) SUNRISE TECAN

Αρχή μεθόδου

Το διάλυμα του θειικού χαλκού επάγει οξείδωση των λιποπρωτεϊνών του ορού. Η εξέλιξη της οξείδωσης παρακολουθείται με μέτρηση της απορρόφησης των προϊόντων οξείδωσης –συζυγή διενικά υδροϋπεροξείδια- στα 245 nm. Καταγράφεται η χρονική εξέλιξη της αντίδρασης και το τελικό αποτέλεσμα εκφράζεται ως χρόνος αντίστασης του ορού στην οξείδωση λόγω της δράσης των συστατικών των αφεψημάτων (LagTime).

Αναλυτική πορεία

Ο ορός που χρησιμοποιήθηκε για την εκτέλεση του πειράματος απομονώθηκε από αίμα υγιών εθελοντών, ηλικίας 22-50 ετών, έπειτα από δωδεκάωρη νηστεία. Το αίμα (5 mL) παρελήφθη με τη χρήση αποστειρωμένης σύριγγας. Μετά το πέρας 30 min από τη χρονική στιγμή της αιμοληψίας πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση (συνθήκες: 10 min, 3000 rpm, 4 °C) ώστε να καθιζάνουν τα έμμορφα συστατικά του αίματος και να γίνει η παραλαβή του ορού σε φιαλίδια eppendorf.

Η πορεία που ακολουθήθηκε για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των αφεψημάτων στις λιποπρωτεΐνες του ορού ήταν κοινή για τα δεκατρία βότανα της μελέτης. Αρχικά, ζυγίζονται σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας ποσότητες στερεού υπολείμματος των αφεψημάτων και διαλυτοποιούνται σε κατάλληλο όγκο απιονισμένου νερού ώστε οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων να είναι 0.0025, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.25, 0.5, 0.75 και 1 mg/mL. Στη συνέχεια, παρασκευάζεται μητρικό διάλυμα $CuSO_4$ συγκέντρωσης 20 mM. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη φιάλη σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως, παρασκευάζεται το διάλυμα εργασίας $CuSO_4$ συγκέντρωσης 200 μM με αραίωση 1:100 του μητρικού διαλύματος $CuSO_4$ με απιονισμένο νερό, το οποίο αραιώνεται περαιτέρω με ρυθμιστικό διάλυμα PBS ώστε η τελική συγκέντρωση του να είναι 10 μM. Παράλληλα, πραγματοποιείται αραίωση του ορού (1:12), επίσης, με χρήση ρυθμιστικού διάλυμα PBS.

Σε επόμενο στάδιο, με τη χρήση ρυμθιζόμενης πιπέττας, πραγματοποιείται μεταφορά 20 μL ορού σε πολυστυρενικό τρυβλίο 96 βοθρίων και ακολουθεί προσθήκη 1μL δείγματος. Η αντίδραση ξεκινά μετά την προσθήκη 230 μL διαλύματος $CuSO_4$ 10 μM, η κινητική της οποίας αξιολογείται με την καταγραφή της απορρόφησης του μίγματος σε φωτόμετρο ELISA, στα 245 nm, για 4 τουλάχιστον ώρες (λήψη μέτρησης ανά 2 λεπτά έπειτα από ανάδευση) λαμβάνοντας γραφήματα, από τα οποία προκύπτει η μέτρηση του LagTime (χρόνος αντίστασης ορού στην οξείδωση).

2.6 Κύτταρα/ Κυτταροκαλλιέργειες

2.6.1 Κύτταρα Περιφερικού Αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs) Ανθρώπου

Το περιφερικό αίμα αποτελείται από ένα υγρό, το πλάσμα, και από κύτταρα τα οποία βρίσκονται υπό τη μορφή εναιωρήματος σε αυτό. Το σύνολο των κυττάρων του περιφερικού αίματος που διαθέτουν ένα σφαιρικό πυρήνα συνιστούν τα κύτταρα του περιφερικού αίματος. Σε αυτά συγκαταλέγονται τα μονοκύτταρα (PBMCs) και τα λεμφοκύτταρα (Β-λεμφοκύτταρα, Τ-λεμφοκύτταρα και κύτταρα «φυσικοί φονείς» (natural killers, NK)), ενώ δε συμπεριλαμβάνονται τα ερυθροκύτταρα και τα αιμοπετάλια, τα οποία δε διαθέτουν καθόλου πυρήνα καθώς και τα ουδετερόφιλα, τα βασεόφιλα και τα ηωσινόφιλα, τα οποία δε διαθέτουν σφαιρικό πυρήνα.

Τα PBMCs που χρησιμοποιήθηκαν για τη εκτίμηση της βιοδραστικότητας των αφεψημάτων απομονώθηκαν από αίμα υγιών εθελοντών, ηλικίας 22-50 ετών, μετά από

δωδεκάωρη νηστεία. Ο τρόπος απομόνωσης και παραλαβής των PBMCs περιγράφεται στην ενότητα που ακολουθεί.

2.6.1.1 Απομόνωση PBMCs

Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέττες (10-1000 μL), με τα αντίστοιχα tips (αποστειρωμένα)
Μηχανική πιπέττα παροχής ελεγχόμενου όγκου
Αποστειρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες (falcon tubes), χωρητικότητας 15 και 50 mL
Αποστειρωμένα σιφώνια, χωρητικότητας 5 και 10 mL
Αποστειρωμένες σύριγγες, χωρητικότητας 20 mL
Αποστειρωμένες πιπέττες Pasteur
Ηπαρίνη (heparin)
Διάλυμα Ficoll (Ficoll solution, 1 g/mL)
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate-buffered saline, PBS)
Καλλιεργητικό υλικό RPMI-1640 (20 μM 4-(2-υδροξυαιθυλ)-1-πιπεραζινοαιθανοσουλφονικό οξύ, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), L- γλουταμίνη, απουσία όξινου ανθρακικού νατρίου, ($NaHCO_3$))
Εμβρυϊκός βόειος ορός (Fetal bovine serum, FBS)
Πενικιλλίνη- στρεπτομυκίνη (penicillin- streptomycin, 100 units/mL-100 μg/mL)

Όργανα

Υδατόλουτρο
Θάλαμος διπλής κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow) εφοδιασμένος με λυχνίες UV
Ψυχόμενη φυγόκεντρος (eppendorf centrifuge 5810 R)

Αναλυτική πορεία

Η απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος βασίζεται στη μέθοδο φυγοκεντρικού διαχωρισμού με διάλυμα Ficoll. Το αίμα (10 mL) μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα των 50 mL και αραιώνεται 1:1 με διάλυμα PBS. Σε ένα δεύτερο δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 15 mL διαλύματος Ficoll. Μετά από ήπια ανάδευση, το αραιωμένο αίμα επιστρώνεται πάνω από το διάλυμα Ficoll και ακολουθεί φυγοκέντρηση (συνθήκες: 1800 rpm, 20 min, 20 °C, χωρίς επιτάχυνση και φρένο). Παράλληλα, τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας τοποθετούνται σε υδατόλουτρο

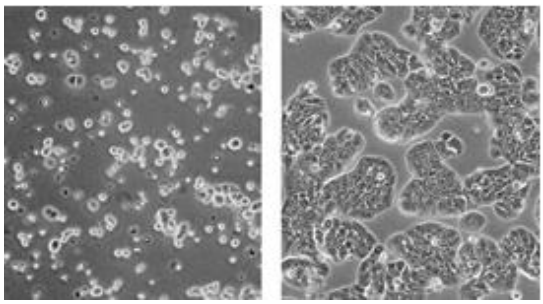
ρυθμισμένο στους 37 °C. Τα PBMCs, τα οποία αποτελούν την ενδιάμεση στιβάδα, παραλαμβάνονται με τη χρήση πιπέττας Pasteur και μεταφέρονται σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 6 mL καλλιεργητικό υλικό RPMI-1640. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 min στις 1800 rpm στους 20 °C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και η διαδικασία πλυσίματος του κυτταρικού ιζήματος επαναλαμβάνεται για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων διαλύματος Ficoll. Τέλος, τα κύτταρα επαναιωρούνται σε κατάλληλο όγκο (~ 6 mL) θρεπτικού υλικού, το οποίο αποτελείται από καλλιεργητικό υλικό RPMI-1640 με προσθήκη 10 % FBS, 100 U/mL πενικιλλίνης και 100 μg/mL στρεπτομυκίνης.

2.6.2 Καρκινικές Κυτταρικές Σειρές του Παχέος Εντέρου και του Προστάτη

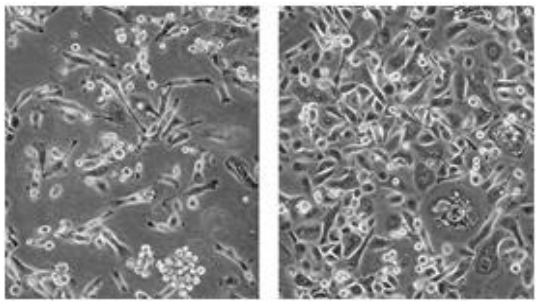
Οι καρκινικές κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν για τη εκτίμηση της βιοδραστικότητας των αφεψημάτων ήταν οι HT29 και PC3.

- HT29: Επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου, τα οποία απομονώθηκαν από όγκο στο κόλον Καυκάσιας γυναίκας ηλικίας 44 ετών.
- PC3: Επιθηλιακά κύτταρα του προστάτη, τα οποία απομονώθηκαν από όγκο στον προστάτη Καυκάσιου ανδρός ηλικίας 62 ετών.

Στις παρακάτω Εικόνες παρουσιάζονται τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των HT29 και PC3 σε συνθήκες καλλιέργειας (Εικόνα 2.1 και 2.2).



Εικόνα 2.1 Κυτταρική σειρά HT29. Αριστερά: χαμηλή πυκνότητα, δεξιά: υψηλή πυκνότητα. Κλίμακα 100μm



Εικόνα 2.2 Κυτταρική σειρά PC3. Αριστερά: χαμηλή πυκνότητα, δεξιά: υψηλή πυκνότητα. Κλίμακα 100μm

2.6.2.1 Καλλιέργεια/ Ανακαλλιέργεια των Κυτταρικών Σειρών

<u>Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα</u>

Αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέττες (10-1000 μL), με τα αντίστοιχα tips (αποστειρωμένα)

Μηχανική πιπέττα παροχής ελεγχόμενου όγκου

Αποστειρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες (falcon tubes), χωρητικότητας 15 και 50 mL

Αποστειρωμένα σιφώνια, χωρητικότητας 5 και 10 mL

Αποστειρωμένες πιπέττες Pasteur

Αποστειρωμένες φιάλες κυτταροκαλλιέργειας, επιφάνειας 75 cm^2

Καλλιεργητικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, D-γλυκόζη 4.5 g/L, L-γλουταμίνη)

Διάλυμα πυροσταφυλικού νατρίου (sodium pyruvate, 100mM)

Εμβρυϊκός βόειος ορός (Fetal bovine serum, FBS)

Πενικιλλίνη- στρεπτομυκίνη (penicillin- streptomycin, 100 units/mL-100 μg/mL)

Διάλυμα θρυψίνης-EDTA (trypsin-EDTA)

Όργανα

Υδατόλουτρο

Φωτονικό μικροσκόπιο

Επωαστικός κλίβανος

Θάλαμος διπλής κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow) εφοδιασμένος με λυχνίες UV

Αρχή μεθόδου

Η *in vitro* διατήρηση και ανακαλλιέργεια των καρκινικών κυττάρων των θηλαστικών (HT29 και PC3), μέσα σε τεχνητό θρεπτικό υλικό, είναι εφικτή με την προϋπόθεση (α) να προσκολληθούν σε στερεό υπόστρωμα (πυθμένας φλασκών, τρυβλίων ή βοθρίων), (β) να τους παρασχεθούν, στις κατάλληλες αναλογίες, όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά, (όπως πηγή άνθρακα, αζώτου κ.α.) και (γ) να διατηρηθούν κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες: 37 °C, 5 % CO_2, 95 % υγρασία.

Αναλυτική πορεία

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στις διαδικασίες που περιγράφονται παρακάτω τοποθετούνται σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 37 °C, περίπου 15 min πριν τη χρήση τους.

Τα κύτταρα διατηρούνται σε φιάλες παρουσία θρεπτικού υλικού (15 mL), το οποίο αποτελείται από καλλιεργητικό υλικό DMEM με προσθήκη 10 % FBS, 1 % διαλύματος άλατος πυροσταφυλικού νατρίου, 100 U/mL πενικιλίνης και 100 μg/mL στρεπτομυκίνης σε ατμόσφαιρα 5 % CO_2, 95 % υγρασία στους 37 °C. Με οπτική μικροσκοπία καθορίζεται η ημέρα ανάπτυξης συνοχής-συρροής των κυττάρων, δηλαδή του σχηματισμού συνεχόμενου μονόστιβου επιθηλίου που καλύπτει την επιφάνεια εργασίας. Ο χρόνος διπλασιασμού είναι 48 h. Η ανανέωση του

καλλιεργητικού υλικού πραγματοποιείται με συχνότητα 2-3 φορές την εβδομάδα. Όταν τα κύτταρα της καλλιέργειας καλύπτουν ~ 80 % του εμβαδού της επιφάνειας της φιάλης, πραγματοποιείται ανακαλλιέργειά τους. Η ανακαλλιέργεια των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου και του προστάτη πραγματοποιείται με τη χρήση διαλύματος θρυψίνης. Αρχικά, το θρεπτικό υλικό απομακρύνεται και η επιφάνεια της φιάλης πλένεται με 5 mL διαλύματος θρυψίνης-EDTA. Το προαναφερθέν βήμα είναι κρίσιμο για την απομάκρυνση υπολειμμάτων ορού στο οποίο περιέχονται αναστολείς θρυψίνης. Στη συνέχεια, προστίθενται 3 mL διαλύματος θρυψίνης-EDTA, το οποίο καταστρέφει τα μόρια προσκόλλησης της επιφάνειας των κυττάρων με το στερεό υπόστρωμα της επιφάνειας της φιάλης. Τα κύτταρα παρατηρούνται στο μικροσκόπιο και το διάλυμα της θρυψίνης απορρίπτεται όταν τα κύτταρα εμφανίσουν τις πρώτες ενδείξεις αποκόλλησης. Ακολούθως, η φιάλη μεταφέρεται στον επωαστικό κλίβανο μέχρι τα κύτταρα να αποκολληθούν από την επιφάνειά της (~ 5 min). Σε επόμενο στάδιο προστίθεται κατάλληλος όγκος θρεπτικού υλικού ώστε τα κύτταρα να μεταφερθούν σε περισσότερες της μιας θυγατρικές φιάλες (αναλογία ανακαλλιέργειας για τα HT29 1:3 έως 1:8 και για τα PC3 1:3 έως 1:6).

2.6.2.2 Κατάψυξη και Απόψυξη Καρκινικών Κυττάρων

<u>Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα</u>

Αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέττες (10-1000 μL), με τα αντίστοιχα tips (αποστειρωμένα)
Μηχανική πιπέττα παροχής ελεγχόμενου όγκου
Αποστειρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες (falcon tubes), χωρητικότητας 15 και 50 mL
Αποστειρωμένα σιφώνια, χωρητικότητας 5 και 10 mL
Αποστειρωμένες πιπέττες Pasteur
Αποστειρωμένα κρυογονικά φιαλίδια (2 mL)
Αποστειρωμένες φιάλες καλλιέργειας, επιφάνειας 75 cm^2
Καλλιεργητικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, D-γλυκόζη 4.5 g/L, L-γλουταμίνη)
Διάλυμα πυροσταφυλικού νατρίου (sodium pyruvate, 100mM)
Εμβρυϊκός βόειος ορός (Fetal bovine serum, FBS)
Πενικιλλίνη- στρεπτομυκίνη (penicillin- streptomycin, 100 units/mL-100 μg/mL)
Διάλυμα θρυψίνης-EDTA (trypsin-EDTA)
Διάλυμα διμεθυλοσουλφοξειδίου (Dimethyl sulfoxide, DMSO)
Διάλυμα ισοπροπυλικής αλκοόλης

Όργανα

Υδατόλουτρο
Φωτονικό μικροσκόπιο
Επωαστικός κλίβανος
Θάλαμος διπλής κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow) εφοδιασμένος με λυχνίες UV
Ψυχόμενη φυγόκεντρος (eppendorf centrifuge 5810 R)
Υπερκαταψύκτης (-80 °C)

Αναλυτική πορεία

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στις διαδικασίες που περιγράφονται παρακάτω τοποθετούνται σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 37 °C περίπου 15 min πριν τη χρήση τους.

Κατάψυξη: Κύτταρα στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης (κάλυψη ~ 80 %) αποκολλώνται από την επιφάνεια της φιάλης με τη διαδικασία που περιγράφεται στην Ενότητα 2.6.2.1 και επαναιωρούνται σε 6 mL θρεπτικού υλικού. Το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρείται σε 500 g για 5 min στους 20 °C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και η διαδικασία του πλυσίματος επαναλαμβάνεται. Ακολούθως, το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε κατάλληλο όγκο διαλύματος ψύξης, σύστασης 70 % θρεπτικό υλικό-20 % FBS-10 % DMSO, ώστε η πυκνότητα των κυττάρων να είναι 5×10^6 κύτταρα/mL. Στη συνέχεια, 1 mL κυτταρικού εναιωρήματος μεταφέρεται σε αποστειρωμένα κρυογονικά φυαλίδια. Η διαδικασία ψύξης πραγματοποιείται με ρυθμό -1 °C/min ως τη θερμοκρασία των -80 °C. Για το σκοπό αυτό τα φιαλίδια τοποθετούνται μέσα σε δοχείο πολυαιθυλενίου που περιέχει ισοπροπυλική αλκοόλη σε υπερκαταψύκτη, όπου παραμένουν για τουλάχιστον 24 h. Τέλος, για μακροχρόνια φύλαξη, τα κύτταρα τοποθετούνται σε δοχεία υγρού αζώτου.

Απόψυξη: Το κρυογονικό φιαλίδιο μεταφέρεται από το δοχείο υγρού αζώτου σε υδατόλουτρο, ρυθμισμένο στους 37 °C έως ότου το κυτταρικό εναιώρημα επέλθει σε υγρή κατάσταση. Στη συνέχεια, τα κύτταρα (1 mL) μεταφέρονται σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 6 mL θρεπτικού υλικού και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση, σε συνθήκες 500 g για 5 min στους 20 °C. Για την απομάκρυνση του διαλύματος ψύξης η διαδικασία του πλυσίματος επαναλαμβάνεται για ακόμα μία φορά. Τέλος, το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 5 mL θρεπτικού υλικού και φέρεται σε φιάλες καλλιέργειας, οι οποίες τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο (συνθήκες: 37 °C, 5 % CO_2, 95 % υγρασία).

2.6.3 Μέτρηση Κυττάρων-Έλεγχος Βιωσιμότητας

Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Αυτόματες ρυθμζόμενες πιπέττες (10-1000 μL), με τα αντίστοιχα tips (αποστειρωμένα)
Αποστειρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες (falcon tubes), χωρητικότητας 15 και 50 mL
Αποστειρωμένα φιαλίδια eppendorf, χωρητικότητας 1.5 mL
Διάλυμα χρωστικής κυανούν του τρυπανίου (trypan blue)

Όργανα

Αιμοκυττόμετρο (πλακίδιο Neubauer)
Φωτονικό μικροσκόπιο
Θάλαμος διπλής κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow) εφοδιασμένος με λυχνίες UV

Αναλυτική πορεία

Η πορεία είναι κοινή για όλα τα είδη κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια εκτίμησης της βιολογικής δραστικότητας των αφεψημάτων της μελέτης.

Το κυτταρικό εναιώρημα (100 μL) μεταφέρεται σε φιαλίδιο eppendorf που περιέχει 900 μL διαλύματος κυανούν του τρυπανίου. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min και με τη βοήθεια αιμοκυττόμετρου πραγματοποιείται μέτρηση των κυττάρων σε φωτονικό μικροσκόπιο. Από τον αριθμό των κυττάρων που έχουν βαφεί κυανά λόγω εισόδου της χρωστικής, υπολογίζεται το ποσοστό βιωσιμότητας σύμφωνα με τη σχέση:

$$Ποσοστό\ βιώσιμων\ κυττάρων\ = \frac{νεκρά\ κύτταρα\ (κυανά)}{συνολικά\ μετρηθέντα\ κύτταρα} \times 100$$

2.7 Διαλυτοποίηση Στερεού Υπολείμματος Αφεψημάτων για τον Έλεγχο Βιοδραστικότητας

Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέττες (10-1000 μL), με τα αντίστοιχα tips (αποστειρωμένα)
Αποστειρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες (falcon tubes), χωρητικότητας 15 mL
Αποστειρωμένες σύριγγες, χωρητικότητας 5 mL
Αποστειρωμένα φίλτρα, διαμέτρου 0.2 μm
Αποστειρωμένα φιαλίδια eppendorf, χωρητικότητας 1.5 mL

Καλλιεργητικό υλικό RPMI-1640 (20 μM 4-(2-υδροξυαιθυλ)-1-πιπεραζινοαιθανοσουλφονικό οξύ, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), L- γλουταμίνη, απουσία όξινου ανθρακικού νατρίου, ($NaHCO_3$))
Καλλιεργητικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, D-γλυκόζη 4.5 g/L, L-γλουταμίνη)

Όργανα

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων
Κυκλοαναδευτήρας Vortex
Λουτρό υπερήχων
Θάλαμος διπλής κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow) εφοδιασμένος με λυχνίες UV
Καταψύκτης (-20 °C)

Αναλυτική πορεία

Αρχικά, τα δείγματα τοποθετούνται σε σκοτεινό και ξηρό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου. Σε επόμενο στάδιο, ζυγίζεται κατάλληλη ποσότητα στερεού υπολείμματος των αφεψημάτων σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας και διαλυτοποιείται σε κατάλληλο όγκο καλλιεργητικού υλικού, RPMI-1640 ή DMEM για την εκτίμηση της καρδιοπροστατευτικής και χημειοπροστατευτικής δράσης αντίστοιχα,, ώστε η συγκέντρωση των δειγμάτων να είναι 200 mg/mL. Ακολούθως, προκειμένου να επιτευχθεί η διαλυτοποίηση, τα δείγματα μεταφέρονται σε λουτρό υπερήχων για 5 min. Στη συνέχεια, τα διαλυτοποιημένα δείγματα μεταφέρονται με χρήση σύριγγας σε φιαλίδια eppendorf, αφού διέλθουν από ηθμό με διάμετρο πόρων 0.2 μm για να αποστειρωθούν. Τέλος, τα δείγματα αποθηκεύονται σε θερμοκρασία -20 °C.

2.8 In vitro Μελέτη της Αντιαθηρογόνου Δράσης των Αφεψημάτων

2.8.1 Μελέτη της Τοξικότητας των Αφεψημάτων στα PBMCs Μέσω Μέτρησης των Επιπέδων της Γαλακτικής Αφυδρογονάσης (Lactate Dehydrogenase, LDH)

Για τη μελέτη της επίδρασης των συστατικών των αφεψημάτων στη βιωσιμότητα των PBMCs, μετρώνται τα επίπεδα της LDH στα υπερκείμενα της καλλιέργειας των PBMCs, με εξειδικευμένο kit.

Επίδραση στα PBMCs με τα αφεψήματα των βοτάνων

Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέττες (1-1000 μL), με τα αντίστοιχα tips (αποστειρωμένα)
Αποστειρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες (falcon tubes), χωρητικότητας 15 και 50 mL
Πολυστυρενικά τρυβλία 24 βοθρίων, επιφάνειας 1.9 cm^2
Καλλιεργητικό υλικό RPMI-1640 (20 μM 4-(2-υδροξυαιθυλ)-1-πιπεραζινοαιθανοσουλφονικό οξύ, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), L- γλουταμίνη, απουσία όξινου ανθρακικού νατρίου, ($NaHCO_3$))

Όργανα

Υδατόλουτρο
Θάλαμος διπλής κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow) εφοδιασμένος με λυχνίες UV
Επωαστικός κλίβανος

Αναλυτική πορεία

Με την πορεία που περιγράφηκε στην Ενότητα 2.6.3, τα κύτταρα καταμετρούνται και διαμοιράζονται σε εξειδικευμένα πολυστυρενικά τρυβλία των 24 βοθρίων. Η πυκνότητα των κυττάρων καθορίζεται στα 10^6 κύτταρα/βοθρίο. Ακολούθως προστίθεται καλλιεργητικό υλικό RPMI-1640 μέχρι τελικού όγκου 1 mL. Τέλος, στην καλλιέργεια προστίθεται κατάλληλος όγκος διαλυτοποιημένων αφεψήματων (0.2, 0.5, 1 και 2 mg/mL) και ακολουθεί επώαση των κυττάρων για 24 h σε επωαστικό κλίβανο (συνθήκες: 37 °C, 5 % CO_2, 95 % υγρασία).

Μέτρηση των επιπέδων της LDH

Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέττες (1-1000 μL), με τα αντίστοιχα tips
Δοκιμαστικοί σωλήνες (falcon tubes), χωρητικότητας 15 mL
Αποστειρωμένα φιαλίδια eppendorf, χωρητικότητας 1.5 mL
Πολυστυρενικά τρυβλία 96 βοθρίων
Καλλιεργητικό υλικό RPMI-1640 (20 μM 4-(2-υδροξυαιθυλ)-1-πιπεραζινοαιθανοσουλφονικό οξύ, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), L- γλουταμίνη, απουσία όξινου ανθρακικού νατρίου, ($NaHCO_3$))
Εξειδικευμένο LDH kit

Όργανα

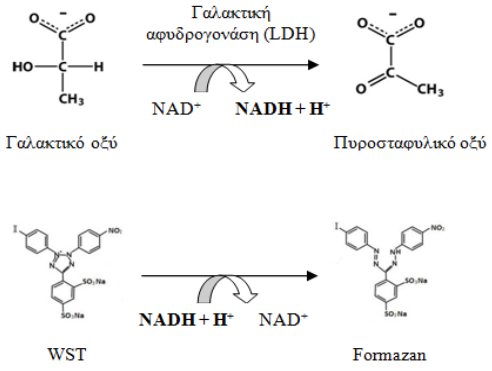
Ψυχόμενη φυγόκεντρος (eppendorf centrifuge 5810 R)

Λουτρό υπερήχων

Φωτόμετρο ELISA (ELISA reader) SUNRISE TECAN

Αρχή μεθόδου

Η γαλακτική αφυδρογονάση καταλύει την αντίδραση οξείδωσης του γαλακτικού οξέος προς πυροσταφυλικό οξύ, ανάγοντας ταυτόχρονα το NAD^+ προς $NADH^+$ και H^+. Στη συνέχεια, το $NADH^+$ ανάγει το υπόστρωμα του kit (WST substrate mix) προς παραγωγή ένωσης κίτρινου χρώματος που απορροφά στα 450 nm (Εικόνα 2.3). Η ένταση του χρώματος συσχετίζεται άμεσα με τον αριθμό των κυττάρων που έχουν υποστεί βλάβη/λύση.



Εικόνα 2.3 Αντίδραση γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH)

Αναλυτική πορεία

Η καλλιέργεια των κυττάρων συλλέγεται και μεταφέρεται σε φιαλίδια eppendorf για φυγοκέντρηση (συνθήκες: 600 g, 5 min, 20 °C). Ο χειρισμός των δειγμάτων διαφέρει ανάλογα με την κατηγορία: για τα low control (αντιστοιχεί στην καλλιέργεια στην οποία δεν έχει επιδράσει κανένας διεγέρτης) και τις καλλιέργειες στις οποίες έχουν επιδράσει τα αφεψήματα, συλλέγεται το υπερκείμενο, ενώ για τα high control (αντιστοιχεί στο σύνολο της ποσότητας του ενζύμου στα κύτταρα της καλλιέργειας), μετά από τη φυγοκέντρηση απομακρύνεται το υπερκείμενο και στο κυτταρικό ίζημα προστίθενται 100 μL καλλιεργητικού υλικού RPMI-1640 και 10 μL διαλύματος λύσης των κυττάρων. Ακολουθεί επώαση σε λουτρό υπερήχων για 2 min και παραλαβή του υπερκειμένου ύστερα από φυγοκέντρηση. Στη συνέχεια, 10μL υπερκειμένου της κάθε κατηγορίας μεταφέρονται σε πολυστυρενικό τρυβλίο των 96 βοθρίων το οποίο περιέχει 100 μL υποστρώματος. Το μίγμα επωάζεται για 30 min σε σκοτεινό μέρος προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αντίδραση και ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης (A) στα 450 nm. Η τοξικότητα των αφεψημάτων στα κύτταρα του περιφερικού αίματος εκτιμάται από τον παρακάτω τύπο.

$$Κυτταροτοξικότητα\ (\%) = \left[\frac{A_{δείγμα} - A_{low\ control}}{A_{high\ control} - A_{low\ control}}\right] \times 100$$

2.8.2 Μελέτη της Επίδρασης των Αφεψημάτων στα Επίπεδα Προφλεγμονωδών Κυτταροκινών

Για τη μελέτη της επίδρασης των συστατικών των αφεψημάτων στα επίπεδα έκφρασης προφλεγμονωδών κυτταροκινών των PBMCs, μετρώνται τα επίπεδα του Ογκονεκρωτικού Παράγοντα-α (Tumor Necrosis Factor-alpha, TNF-α), της Ιντερλευκίνης-6 (Interleukin-6, IL-6) και της Χημειοτακτικής Πρωτεΐνης Μονοκυττάρων-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1, MCP-1) στα υπερκείμενα της καλλιέργειας των PBMCs με εξειδικευμένα kit.

Επίδραση στα PBMCs με τα αφεψήματα των βοτάνων

Η πορεία είναι κοινή με αυτή που περιγράφηκε στην Ενότητα 2.8.1. Οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν ήταν 0.5, 0.2, 0.1, 0.05 mg/mL.

Διέγερση των κυττάρων του περιφερικού αίματος- Μοντέλο φλεγμονής

Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέττες (1-1000 μL), με τα αντίστοιχα tips (αποστειρωμένα)
Καλλιεργητικό υλικό RPMI-1640 (20 μM 4-(2-υδροξυαιθυλ)-1-πιπεραζινοαιθανοσουλφονικό οξύ, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), L- γλουταμίνη, απουσία όξινου ανθρακικού νατρίου, ($NaHCO_3$))
Λιποπολυσακχαρίδιο LPS (ενδοτοξίνη από το βακτήριο Escherichia *coli*)

Όργανα

Θάλαμος διπλής κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow) εφοδιασμένος με λυχνίες UV
Επωαστικός κλίβανος

Αρχή μεθόδου

Το λιποπολυσακχαρίδιο LPS λειτουργεί ως ενδοτοξίνη καθώς συνδέεται στον υποδοχέα CD14/TLR4/MD2, ο οποίος απαντάται σε ποικίλους κυτταρικούς τύπους, ειδικότερα όμως σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (μονοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα και Β-λεμφοκύτταρα). Η σύνδεση της συγκεκριμένης ενδοτοξίνης στον υποδοχέα της πυροδοτεί ένα σηματοδοτικό καταρράκτη με αποτέλεσμα την έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών, οξειδίου του αζώτου και εικοσανοειδών. Η παρουσία LPS σε κυτταρική καλλιέργεια, διεγείρει

τα κύτταρα, προσομοιώνοντας ένα μοντέλο φλεγμονής, με επακόλουθο την έκφραση και παραγωγή των προαναφερθέντων μορίων.

Αναλυτική πορεία

Στην καλλιέργεια των κυττάρων του περιφερικού αίματος προστέθηκε 1μL (2μg/mL) ενδοτοξίνης LPS. Η πρόκληση του μοντέλου φλεγμονής και η επίδραση των αφεψημάτων αξιολογήθηκαν συναρτήσει μη διεγερμένων κυττάρων έπειτα από επώαση των κυττάρων για 24 h σε επωαστικό κλίβανο (συνθήκες: 37 ℃, 5 % CO_2, 95 % υγρασία).

Μέτρηση των επιπέδων του Παράγοντα Νέκρωσης Όγκων (Tumor Necrosis Factor-alpha, TNF-α), της Ιντερλευκίνης-6 (Interleukin-6, IL-6) και της Χημειοτακτικής Πρωτεΐνης Μονοκυτταρων-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1, MCP-1)

Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Αυτόματη πιπέττα (100-1000 μL), με τα αντίστοιχα tips
Αυτόματη ρυθμιζόμενη πολυκάναλη πιπέττα (20-200 μL), με τα αντίστοιχα tips
Δοκιμαστικοί σωλήνες (falcon tubes), χωρητικότητας 15 mL
Αποστειρωμένα φιαλίδια eppendorf, χωρητικότητας 1.5 mL
Πολυστυρενικά τρυβλία 96 βοθρίων (high-binding)
Εξειδικευμένο Duoset ELISA kit για τη μέτρηση του TNF-α
Εξειδικευμένο Duoset ELISA kit για τη μέτρηση της IL-6
Εξειδικευμένο Duoset ELISA kit για τη μέτρηση της MCP-1
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate-buffered saline, PBS)

Όργανα

Ψυχόμενη φυγόκεντρος (eppendorf centrifuge 5810 R)
Φωτόμετρο ELISA (ELISA reader) SUNRISE TECAN

Αρχή μεθόδου

Οι προς μέτρηση κυτταροκίνες (TNF-α/IL-6/MCP-1) προσδένονται αρχικά σε μονοκλωνικό αντίσωμα anti-TNF-a/anti-IL-6/anti-MCP-1, ενώ, στη συνέχεια για τον ανοσοπροσδιορισμό προστίθεται πολυκλωνικό αντίσωμα ανιχνευτής της κάθε προσδεδεμένης κυτταροκίνης στο μονοκλωνικό αντίσωμα. Μετά από πλύσιμο για την απομάκρυνση άλλων πρωτεϊνών,

προστίθεται υπόστρωμα και λαμβάνει χώρα χρωματομετρική αντίδραση. Το προϊόν της αντίδρασης απορροφά στα 450 nm.

Αναλυτική πορεία

Η καλλιέργεια των κυττάρων συλλέγεται και μεταφέρεται σε φιαλίδια eppendorf για φυγοκέντρηση (συνθήκες: 600 g, 5 min, 20 °C).Τα επίπεδα των κυτταροκινών στο υπερκείμενο της καλλιέργειας μετρώνται σε φωτόμετρο ELISA με χρήση εξειδικευμένων sandwich kit και σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρίας. Αρχικά προετοιμάζονται τα αντιδραστήρια και τα πρότυπα που θα χρησιμοποιηθούν σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Στις αντίστοιχες θέσεις του πολυστυρενικού τρυβλίου των 96 βοθρίων προστίθενται 100 μL μονοκλωνικού αντισώματος (διαλυτοποιημένου σε PBS) και το τρυβλίο αφήνεται επί 12 h για επώαση. Σε επόμενο στάδιο, μετά από πλύση για την απομάκρυνση του υπερκείμενου, σε κάθε βοθρίο προστίθενται 300 μL διαλύματος Reagent Diluent. Ακολουθεί επώαση για 1 h και εκ νέου πλύση (εις τετραπλούν) για την απομάκρυνση του υπερκείμενου. Στη συνέχεια προστίθενται τα δείγματα (μετά από κατάλληλη αραίωση) τα οποία αφήνονται για επώαση επί 2 h σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από πλύση, γίνεται προσθήκη 100 μL του πολυκλωνικού αντισώματος. Το υπερκείμενο απορρίπτεται μετά από επώαση 2 h, και στη συνέχεια προστίθενται 100 μL του ενζύμου Streptavidin-HRP (επώαση 20 min). Ύστερα από εκ νέου έκπλυση των βοθρίων, προστίθενται 100 μL από το Substrate Solution. Ακολουθεί και πάλι επώαση για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου, σε συνθήκες σκότους. Σε τελικό στάδιο, προστίθενται 50 μL Stop Solution, και πραγματοποιείται απευθείας μέτρηση της απορρόφησης στα 450 nm. Για την έκφραση των αποτελεσμάτων σε pg/mL, κατασκευάζονται καμπύλες αναφοράς για τις αντίστοιχες κυτταροκίνες (TNF-α, IL-6 και MCP-1).

Πρότυπες καμπύλες αναφοράς TNF-α, IL-6 και MCP-1

Για την κατασκευή των πρότυπων καμπυλών παρασκευάζονται διαλύματα των αντίστοιχων κυτταροκινών σε συγκεντρώσεις 1000, 500, 250, 125, 62,5 και 31.2 pg/mL από μητρικό διάλυμα συγκέντρωσης 2000 pg/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 x αποδίδονται οι τιμές της απορρόφησης στα 450 nm και στον άξονα των y αποδίδονται οι τιμές συγκέντρωσης των κυτταροκινών σε pg/mL.

2.9 Μελέτη της Χημειοπροστατευτικής Δράσης των Αφεψημάτων In Vitro

2.9.1 Μελέτη της Αναστολής του Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού των HT29 και PC3 από τα Αφεψήματα

2.9.1.1 Εκτίμηση του Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού με τη Μέθοδο Crystal Violet

Επίδραση στα HT29 και PC3 με τα αφεψήματα των βοτάνων

Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέττες (1-200 μL), με τα αντίστοιχα tips (αποστειρωμένα)
Αυτόματη ρυθμιζόμενη πολυκάναλη πιπέττα (20-200 μL), με τα αντίστοιχα tips (αποστειρωμένα)
Αποστειρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες (falcon tubes), χωρητικότητας 15 και 50 mL
Πολυστυρενικά τρυβλία 96 βοθρίων, επιφάνειας 0.32 cm^2
Καλλιεργητικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, D-γλυκόζη 4.5 g/L, L-γλουταμίνη)
Διάλυμα πυροσταφυλικού νατρίου (sodium pyruvate, 100mM)
Πενικιλλίνη- στρεπτομυκίνη (penicillin- streptomycin, 100 units/mL-100 μg/mL)
Εμβρυϊκός βόειος ορός (Fetal bovine serum, FBS)

Όργανα

Υδατόλουτρο
Θάλαμος διπλής κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow) εφοδιασμένος με λυχνίες UV
Επωαστικός κλίβανος

Αναλυτική πορεία

Η πορεία είναι κοινή για το σύνολο των βοτάνων της μελέτης και στις δυο κυτταρικές σειρές. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στις διαδικασίες που περιγράφονται παρακάτω τοποθετούνται σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 37 ℃ περίπου 15 min πριν τη χρήση τους.

Με την πορεία που περιγράφηκε στην Ενότητα 2.6.3, τα κύτταρα μετρώνται και διαμοιράζονται σε εξειδικευμένα πολυστυρενικά τρυβλία των 96 βοθρίων. Η πυκνότητα των κυττάρων καθορίζεται στα 8×10^3 κύτταρα/βοθρίο. Ακολούθως προστίθεται θρεπτικό υλικό, που αποτελείται από καλλιεργητικό υλικό DMEM με προσθήκη 10 % FBS, 1 % διαλύματος

πυροσταφυλικού νατρίου, 100 U/mL πενικιλλίνης και 100 μg/mL στρεπτομυκίνης, μέχρι τελικού όγκου 200 μL. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων για 24 h σε επωαστικό κλίβανο (συνθήκες: 37 °C, 5 % CO_2, 95 % υγρασία) ώστε να επιτευχθεί η προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια των βοθρίων. Μετά το πέρας των 24 h, το θρεπτικό υλικό ανανεώνεται και πραγματοποιείται η επίδραση με τα διαλύματα των αφυδατωμένων αφεψημάτων σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL. Τέλος, η καλλιέργεια μεταφέρεται σε επωαστικό κλίβανο (συνθήκες: 37 °C, 5 % CO_2, 95 % υγρασία). Η επίδραση των αφεψημάτων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό εκτιμήθηκε ύστερα από 24, 48 και 72 h επώασης.

Σήμανση ζωντανών κυττάρων με τη χρωστική Crystal Violet

Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέττες (20-200 μL), με τα αντίστοιχα tips
Αυτόματη ρυθμιζόμενη πολυκάναλη πιπέττα (20-200 μL), με τα αντίστοιχα tips
Δοκιμαστικοί σωλήνες (falcon tubes), χωρητικότητας 50 mL
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate-buffered saline, PBS)
Μεθανόλη (MeOH) αναλυτικής καθαρότητας
Διάλυμα χρωστικής κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet, 0.5 % σε 20 % MeOH)
Οξικό οξύ (Acetic acid, AcOH) αναλυτικής καθαρότητας

Όργανα

Φωτόμετρο ELISA (ELISA reader) SUNRISE TECAN

Αρχή μεθόδου

Η χρωστική κρυσταλλικού ιώδους έχει την ικανότητα να εισχωρεί στο εσωτερικό των κυττάρων, όταν αυτά έχουν μονιμοποιηθεί με αντιδραστήρια που απολιπαίνουν (de-fat) την κυτταρική μεμβράνη (Ενότητα 2.9.2.1) Στο εσωτερικό των κυττάρων η χρωστική προσδένεται σε μόρια σακχάρων, μεταξύ αυτών και το DNA. Αποτέλεσμα είναι η σήμανση των κυττάρων, η λύση των οποίων προσδίδει στο μίγμα ιώδες χρώμα. Η ένταση της απορρόφησης του διαλύματος, η οποία σχετίζεται άμεσα με τον αριθμό των κυττάρων της καλλιέργειας, αξιολογείται στα 550 nm.

Αναλυτική πορεία

Αρχικά, πραγματοποιείται απόρριψη του θρεπτικού υλικού της καλλιέργειας. Το βήμα αυτό είναι κρίσιμο για την απομάκρυνση των νεκρών κυττάρων, τα οποία έχουν αποκολληθεί από την

επιφάνεια των βοθρίων. Ακολουθεί έκπλυση των βοθρίων με διάλυμα PBS (εις διπλούν), ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα θρεπτικού μέσου. Στη συνέχεια τα κύτταρα μονιμοποιούνται με μεθανόλη (20%) και σημαίνονται ύστερα από επώαση με 70 μL διαλύματος χρωστικής κρυσταλλικού ιώδους για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας των 15 min, το διάλυμα της χρωστικής απορρίπτεται και το περιεχόμενο των βοθρίων εκπλένεται με 200 μL απιονισμένου νερού εις τετραπλούν, ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα της χρωστικής. Τέλος, μετά την απομάκρυνση κάθε ίχνους υγρασίας, προστίθενται 200 μL διαλύματος οξικού οξέος (10 % v/v). Η απορρόφηση του διαλύματος μετράται στα 550 nm έπειτα από 10 min επώασης υπό ανάδευση, ώστε να επιτευχθεί η λύση των κυττάρων.

2.9.1.2 Εκτίμηση της Μιτοχονδριακής Λειτουργίας με τη Μέθοδο MTT

Επίδραση στα HT29 και PC3 με τα αφεψήματα των βοτάνων

Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέττες (1-200 μL), με τα αντίστοιχα tips (αποστειρωμένα)
Αυτόματη ρυθμιζόμενη πολυκάναλη πιπέττα (20-200 μL), με τα αντίστοιχα tips (αποστειρωμένα)
Αποστειρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες (falcon tubes), χωρητικότητας 15 και 50 mL
Πολυστυρενικά τρυβλία 96 βοθρίων, επιφάνειας 0.32 cm^2
Καλλιεργητικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, D-γλυκόζη 4.5 g/L, L-γλουταμίνη)
Διάλυμα πυροσταφυλικού νατρίου (sodium pyruvate, 100mM)
Πενικιλλίνη- στρεπτομυκίνη (penicillin- streptomycin, 100 units/mL-100 μg/mL)
Εμβρυϊκός βόειος ορός (Fetal bovine serum, FBS)

Όργανα

Υδατόλουτρο
Θάλαμος διπλής κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow) εφοδιασμένος με λυχνίες UV
Επωαστικός κλίβανος

Αναλυτική πορεία

Η πορεία είναι κοινή για το σύνολο των βοτάνων της μελέτης. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στις διαδικασίες που περιγράφονται παρακάτω τοποθετούνται σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 37 °C περίπου 15 min πριν τη χρήση τους.

Με την πορεία που περιγράφηκε στην Ενότητα 2.6.3, τα κύτταρα μετρώνται και διαμοιράζονται σε εξειδικευμένα πολυστυρενικά τρυβλία των 96 βοθρίων. Η πυκνότητα των κυττάρων καθορίζεται στα 5×10^3 κύτταρα/βοθρίο και 3×10^3 κύτταρα/βοθρίο για τα HT29 και τα PC3, αντίστοιχα. Ακολούθως προστίθεται θρεπτικό υλικό, που αποτελείται από καλλιεργητικό υλικό DMEM με προσθήκη 10 % FBS, 1 % διαλύματος πυροσταφυλικού νατρίου, 100 U/mL πενικιλλίνης και 100 μg/mL στρεπτομυκίνης, μέχρι τελικού όγκου 200 μL. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων για 24 h σε επωαστικό κλίβανο (συνθήκες: 37 °C, 5 % CO_2, 95 % υγρασία) ώστε να επιτευχθεί η προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια των βοθρίων. Μετά το πέρας των 24 h, το θρεπτικό υλικό ανανεώνεται και πραγματοποιείται η επίδραση με τα διαλύματα των αφυδατωμένων αφεψημάτων σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL. Τέλος, η καλλιέργεια μεταφέρεται σε επωαστικό κλίβανο (συνθήκες: 37 °C, 5 % CO_2, 95 % υγρασία). Η επίδραση των αφεψημάτων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό εκτιμήθηκε ύστερα από 24, 48 και 72 h επώασης.

Αξιολόγηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας με τη μέθοδο MTT

Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέττες (20-200 μL), με τα αντίστοιχα tips (αποστειρωμένα)
Αυτόματη ρυθμιζόμενη πολυκάναλη πιπέττα (20-200 μL), με τα αντίστοιχα tips (αποστειρωμένα)
Αποστειρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες (falcon tubes), χωρητικότητας 15 και 50 mL
Αποστειρωμένες σύριγγες, χωρητικότητας 20 mL
Αποστειρωμένα φίλτρα, διαμέτρου 0.2 μm
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate-buffered saline, PBS)
Διάλυμα MTT (3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide, 5 mg/mL σε PBS)
Διάλυμα διμεθυλοσουλφοξειδίου (Dimethyl sulfoxide, DMSO)

Όργανα

Υδατόλουτρο
Θάλαμος διπλής κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow) εφοδιασμένος με λυχνίες UV
Επωαστικός κλίβανος

Φωτόμετρο ELISA (ELISA reader) SUNRISE TECAN

Αρχή μεθόδου

Η χρωστική MTT έχει την ικανότητα να διεισδύει στη μεμβράνη των κυττάρων και να συσσωρεύεται στον ενδοκυττάριο χώρο. Οι δακτύλιοι τετραζολίου της κίτρινης χρωστικής MTT διασπώνται από το ένζυμο γαλακτική αφυδρογονάση, το οποίο απαντάται στα μιτοχόνδρια, προς σχηματισμό πορφυρών δυσδιάλυτων σε υδατικά διαλύματα κρυστάλλων. Η διαλυτοποίηση των κρυστάλλων προσδίδει στο μίγμα χαρακτηριστικό ιώδες χρώμα. Η ένταση της απορρόφησης του διαλύματος, η οποία σχετίζεται άμεσα με τη μιτοχονδριακή λειτουργία των ζώντων κυττάρων, αξιολογείται στα 550 nm.

Αναλυτική πορεία

Αρχικά, παρασκευάζεται το διάλυμα της χρωστικής MTT (συγκέντρωση: 5 mg/mL σε PBS). Πριν τη χρήση του, το διάλυμα διέρχεται από φίλτρο με διάμετρο πόρων 0.2 μm προκειμένου να κατακρατηθούν μη διαλυτοποιημένοι κόκκοι της χρωστικής. Εν συνεχεία, 20 μL του διαλύματος MTT προστίθενται στην καλλιέργεια. Υστέρα από 4 h επώασης σε επωαστικό κλίβανο (συνθήκες: 37 °C, 5 % CO_2, 95 % υγρασία), το υπερκείμενο της καλλιέργειας απορρίπτεται και απομακρύνονται τυχόν κατάλοιπα. Τέλος, προστίθενται 200 μL διαλύματος διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Η απορρόφηση του διαλύματος μετράται στα 550 nm ύστερα από 15 min επώασης υπό ανάδευση, ώστε να επιτευχθεί η διαλυτοποίηση των κρυστάλλων.

2.9.1.3 Απεικόνιση της Επίδρασης των Αφεψημάτων στον Κυτταρικό Πολλαπλασιασμό των Καρκινικών Κυττάρων Ύστερα από Χρώση Κατά Giemsa

Επίδραση στα HT29 και PC3 με τα αφεψήματα των βοτάνων

Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέττες (1-1000 μL), με τα αντίστοιχα tips (αποστειρωμένα)
Μηχανική πιπέττα παροχής ελεγχόμενου όγκου
Αποστειρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες (falcon tubes), χωρητικότητας 50 mL
Αποστειρωμένα σιφώνια, χωρητικότητας 5 και 10 mL
Αποστειρωμένες πιπέττες Pasteur
Πολυστυρενικά τρυβλία 12 βοθρίων, επιφάνειας 3.8 cm^2

Καλλιεργητικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, D-γλυκόζη 4.5 g/L, L-γλουταμίνη)
Διάλυμα πυροσταφυλικού νατρίου (sodium pyruvate, 100mM)
Πενικιλλίνη- στρεπτομυκίνη (penicillin- streptomycin, 100 units/mL-100 μg/mL)
Εμβρυϊκός βόειος ορός (Fetal bovine serum, FBS)

Όργανα

Υδατόλουτρο
Θάλαμος διπλής κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow) εφοδιασμένος με λυχνίες UV
Επωαστικός κλίβανος

Αναλυτική πορεία

Η πορεία είναι κοινή για το σύνολο των βοτάνων της μελέτης και στις δυο κυτταρικές σειρές. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στις διαδικασίες που περιγράφονται παρακάτω τοποθετούνται σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 37 °C περίπου 15 min πριν τη χρήση τους.

Με την πορεία που περιγράφηκε στην Ενότητα 2.6.3, τα κύτταρα μετρώνται και διαμοιράζονται σε εξειδικευμένα πολυστυρενικά τρυβλία των 12 βοθρίων. Η πυκνότητα των κυττάρων καθορίζεται στα 25×10^4 κύτταρα/βοθρίο. Ακολούθως προστίθεται θρεπτικό υλικό, που αποτελείται από καλλιεργητικό υλικό DMEM με προσθήκη 10 % FBS, 1 % διαλύματος πυροσταφυλικού νατρίου, 100 U/mL πενικιλλίνης και 100 μg/mL στρεπτομυκίνης, μέχρι τελικού όγκου 2 mL. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων για 24 h σε επωαστικό κλίβανο (συνθήκες: 37 °C, 5 % CO_2, 95 % υγρασία) ώστε να επιτευχθεί η προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια των βοθρίων. Μετά το πέρας των 24 h, το θρεπτικό υλικό ανανεώνεται και πραγματοποιείται η επίδραση με τα διαλύματα των αφυδατωμένων αφεψημάτων σε συγκέντρωση 1 μg/μL. Τέλος, η καλλιέργεια μεταφέρεται σε επωαστικό κλίβανο (συνθήκες: 37 °C, 5 % CO_2, 95 % υγρασία). Η επίδραση των αφεψημάτων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό εκτιμήθηκε ύστερα από 72 h επώασης.

Μονιμοποίηση και σήμανση των ζωντανών κυττάρων με τη χρωστική Giemsa

Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Μηχανική πιπέττα παροχής ελεγχόμενου όγκου
Αποστειρωμένα σιφώνια, χωρητικότητας 5 και 10 mL

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate-buffered saline, PBS)

Διάλυμα φορμαλδεΰδης (Formaldehyde, CH_2O, 3-4 %)

Απιονισμένο νερό

Διάλυμα χρωστικής Giemsa

Όργανα

Μικροσκόπιο ορατού συνδεδεμένο με ψηφιακή κάμερα λήψης εικόνων / βίντεο Zeiss Axioplan2

Αρχή μεθόδου

Η προσθήκη διαλύματος φορμαλδεΰδης σε κύτταρα οδηγεί στη μονιμοποίησή τους μέσω της δημιουργίας ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ των πρωτεϊνών των κυττάρων, χωρίς ωστόσο να καταστρέφεται η δευτεροταγής δομή τους. Επιπλέον επιφέρει τη δημιουργία πόρων στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων που επιτρέπουν την εισχώρηση μορίων (όπως αντισωμάτων ή χρωστικών) στο εσωτερικό του κυττάρου, σημαίνοντας την κατάσταση στην οποία βρίσκονται τα μονιμοποιημένα κύτταρα. Η χρωστική Giemsa, η οποία αποτελείται από ένα μίγμα χρωστικών ουσιών (methylene blue, eosin, και Azure B), έχει την ικανότητα να διεισδύει στη μεμβράνη μονιμοποιημένων κυττάρων με αποτέλεσμα τη σήμανσή τους με ροζ, ιώδες ή/και μπλε χρώμα, ανάλογα με το είδος του κυττάρου.

Αναλυτική πορεία

Αρχικά, πραγματοποιείται απόρριψη του θρεπτικού υλικού της καλλιέργειας. Το βήμα αυτό είναι κρίσιμο για την απομάκρυνση των νεκρών κυττάρων, τα οποία έχουν αποκολληθεί από την επιφάνεια των βοθρίων. Ακολουθεί έκπλυση των βοθρίων με διάλυμα PBS, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα θρεπτικού μέσου. Στη συνέχεια τα κύτταρα μονιμοποιούνται έπειτα από επώαση με 1 mL διαλύματος φορμαλδεΰδης για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας των 10 min, το διάλυμα της φορμαλδεΰδης απορρίπτεται και το περιεχόμενο των βοθρίων εκπλένεται αρχικά με 1 mL διάλυματος PBS εις διπλούν και στη συνέχεια με 1 mL απιονισμένο νερό. Ακολούθως στα μονιμοποιημένα κύτταρα προστίθεται 1 mL διαλύματος χρωστικής Giemsa. Ύστερα από επώαση 1 h υπό ανάδευση, το διάλυμα της χρωστικής απορρίπτεται και το περιεχόμενο των βοθρίων εκπλένεται με 3 mL απιονισμένου νερού εις δεκαπλούν, ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα της χρωστικής. Τέλος, μετά την απομάκρυνση κάθε ίχνους υγρασίας τα κύτταρα παρατηρούνται στο μικροσκόπιο και λαμβάνεται η εικόνα της καλλιέργειας με τη χρήση φωτογραφικής μηχανής.

2.9.2 Μελέτη των Μηχανισμών Χημειοπροστατευτικής Δράσης των Αφεψημάτων

2.9.2.1 Μελέτη της Επίδρασης των Αφεψημάτων στα Στάδια του Κυτταρικού Κύκλου των HT29 και PC3 με τη Μέθοδο της Κυτταρομετρίας Ροής (Flow Cytometry, Fluorescence-Activated Cell Sorting, FACS)

Επίδραση στα HT29 και PC3 με τα αφεψήματα των βοτάνων

Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέττες (1-1000 μL), με τα αντίστοιχα tips (αποστειρωμένα)
Μηχανική πιπέττα παροχής ελεγχόμενου όγκου
Αποστειρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες (falcon tubes), χωρητικότητας 15 και 50 mL
Αποστειρωμένα σιφώνια, χωρητικότητας 5 και 10 mL
Αποστειρωμένες πιπέττες Pasteur
Πολυστυρενικά τρυβλία 6 βοθρίων, επιφάνειας 9.5 cm^2
Καλλιεργητικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, D-γλυκόζη 4.5 g/L, L-γλουταμίνη)
Διάλυμα πυροσταφυλικού νατρίου (sodium pyruvate, 100mM)
Πενικιλλίνη- στρεπτομυκίνη (penicillin- streptomycin, 100 units/mL-100 μg/mL)
Εμβρυϊκός βόειος ορός (Fetal bovine serum, FBS)

Όργανα

Υδατόλουτρο
Θάλαμος διπλής κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow) εφοδιασμένος με λυχνίες UV
Επωαστικός κλίβανος

Αναλυτική πορεία

Η πορεία είναι κοινή για το σύνολο των βοτάνων της μελέτης. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στις διαδικασίες που περιγράφονται παρακάτω τοποθετούνται σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 37 °C περίπου 15 min πριν τη χρήση τους.

Με την πορεία που περιγράφηκε στην Ενότητα 2.6.3, τα κύτταρα μετρώνται και διαμοιράζονται σε εξειδικευμένα πολυστυρενικά τρυβλία των 6 βοθρίων. Η πυκνότητα των κυττάρων καθορίζεται στα 8×10^5 κύτταρα/βοθρίο και 5×10^5 κύτταρα/βοθρίο για τα HT29 και τα PC3, αντίστοιχα. Ακολούθως προστίθεται θρεπτικό υλικό, που αποτελείται από

καλλιεργητικό υλικό DMEM με προσθήκη 10 % FBS, 1 % διαλύματος πυροσταφυλικού νατρίου, 100 U/mL πενικιλλίνης και 100 μg/mL στρεπτομυκίνης, μέχρι τελικού όγκου 3 mL. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων για 24 h σε επωαστικό κλίβανο (συνθήκες: 37 °C, 5 % CO_2, 95 % υγρασία) ώστε να επιτευχθεί η προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια των βοθρίων. Μετά το πέρας των 24 h, το θρεπτικό υλικό ανανεώνεται και πραγματοποιείται η επίδραση με τα διαλύματα των αφυδατωμένων αφεψημάτων σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL. Τέλος, η καλλιέργεια μεταφέρεται σε επωαστικό κλίβανο (συνθήκες: 37 °C, 5 % CO_2, 95 % υγρασία). Η επίδραση των αφεψημάτων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό εκτιμήθηκε ύστερα από 24, 48 και 72 h επώασης.

Μονιμοποίηση των καρκινικών κυττάρων

Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέττες (100-1000 μL), με τα αντίστοιχα tips
Δοκιμαστικοί σωλήνες (falcon tubes), χωρητικότητας 15 mL
Αποστειρωμένες πιπέττες Pasteur
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate-buffered saline, PBS)
Διάλυμα θρυψίνης-EDTA (trypsin-EDTA)
Απόλυτη αιθανόλη (Ethanol absolute, EtOH)

Όργανα

Υδατόλουτρο
Ψυχόμενη φυγόκεντρος (eppendorf centrifuge 5810 R)
Κυκλοαναδευτήρας Vortex
Ψύκτης (2-4 °C)

Αρχή μεθόδου

Η προσθήκη αιθυλικής αλκοόλης σε υδατικό εναιώρημα κυττάρων προκαλεί τη μετουσίωση του συνόλου των πρωτεϊνών (συνήθως τροποποιώντας τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, υπεύθυνες για τη τριτοταγή δομή τους) και την απομάκρυνση λιπιδίων από τη πλασματική μεμβράνη των κυττάρων. Αποτέλεσμα είναι τα κύτταρα να «σταθεροποιούνται/μονιμοποιούνται» στη μεταβολική κατάσταση που βρίσκονται τη στιγμή της προσθήκης, ενώ οι πόροι στην πλασματική μεμβράνη, λόγω της απομάκρυνσης των λιπιδίων, επιτρέπουν την εισχώρηση

μορίων (όπως αντισωμάτων ή χρωστικών) στο εσωτερικό του κυττάρου, επιτρέποντας τη σήμανση της κατάστασης στην οποία βρίσκονται τα μονιμοποιημένα κύτταρα.

Αναλυτική πορεία

Η πορεία είναι κοινή για το σύνολο των δειγμάτων και στις δυο κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν. Αρχικά, το θρεπτικό υλικό (3 mL) συλλέγεται σε δοκιμαστικό σωλήνα. Στη συνέχεια, τα κύτταρα πλένονται με 1 mL διαλύματος PBS και ακολούθως προστίθεται στην καλλιέργεια 0.5 mL διαλύματος θρυψίνης ώστε να αποκολληθούν από την επιφάνεια του τρυβλίου (επώαση 5 min). Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, τα κύτταρα μεταφέρονται στο δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει το θρεπτικό υλικό. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε συνθήκες 500 g, 5 min, 20 °C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 1 mL διαλύματος PBS. Ακολουθεί εκ νέου φυγοκέντρηση, απόρριψη του υπερκειμένου και επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος σε 1 mL διαλύματος PBS. Τέλος, προστίθεται στάγνην 1 mL διαλύματος παγωμένης (-20 °C) αιθυλικής αλκοόλης, υπό συνεχή ανάδευση. Τα δείγματα μεταφέρονται στους 4 °C όπου και μπορούν να διατηρηθούν για χρονικό διάστημα μέχρι 1 μήνα.

Αξιολόγηση της κατανομής των κυττάρων στα στάδια του κυτταρικού κύκλου με τη μέθοδο FACS

Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέττες (10-1000 μL), με τα αντίστοιχα tips
Φιαλίδια eppendorf, χωρητικότητας 1.5 mL
Δοκιμαστικοί σωλήνες (falcon tubes), χωρητικότητας 5 mL
Πιπέττες Pasteur
Αποστειρωμένες σύριγγες, χωρητικότητας 5 mL
Διάλυμα κυτταρομετρητή (FACS sheath fluid)
Διάλυμα διμεθυλοσουλφοξειδίου (Dimethyl sulfoxide, DMSO)
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate-buffered saline, PBS)
Διάλυμα ιωδιούχου προπιδίου (Propidium Iodide, PI, 4 mg/mL σε DMSO)
Διάλυμα tris- υδροχλωρίου (Tris-HCl, 1 M, pH 7.5)
Διάλυμα χλωριούχου μαγνησίου (Magnesium chloride, $MgCl_2$, 1 M)
Διάλυμα ενζύμου ριβονουκλεάσης A (RNAse A, 10 mg/mL)

Όργανα

Ψυχόμενη φυγόκεντρος (eppendorf centrifuge 5810 R)

Συσκευή κυτταρομετρίας ροής, FACS Calibur™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)

Λογισμικό ModFit (Verity Software House, Topsham, ME, USA)

Αρχή μεθόδου

Η Κυτταρομετρία Ροής (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS) αποτελεί μια αυτοματοποιημένη μέθοδο, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί (1) για την ανάλυση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών κυττάρων και σωματιδίων, (2) για την ποσοτική έκφραση κυτταρικών συστατικών και (3) για την ανάλυση των κυτταρικών λειτουργιών και αλληλεπιδράσεων, έχοντας ως βάση τη σκέδαση και το φθορισμό. Η μελέτη του κυτταρικού κύκλου με τη μέθοδο αυτή βασίζεται στη χρήση φθορίζουσας ουσίας (PI), η οποία προσδένεται στοιχειομετρικά στο DNA με αποτέλεσμα τη σήμανσή του. Δεδομένου ότι κάποιες ουσίες έχουν την ικανότητα πρόσδεσης και στο RNA απαιτείται η χρήση διαλύματος ενζύμου RNάσης (RNAse), για την αποικοδόμησή του προς αποφυγή σφαλμάτων. Η ένταση του φθορισμού σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του γενετικού υλικού επιτρέποντας την εκτίμηση της κατανομής του πληθυσμού των κυττάρων της καλλιέργειας στα στάδια του κυτταρικού κύκλου.

Αναλυτική πορεία

Αρχικά το κυτταρικό εναιώρημα (μονιμοποιημένα κύτταρα) φυγοκεντρείται σε συνθήκες 1200 rpm, 4 °C για 10 min. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 0.5 mL διαλύματος χρώσης (Kostakis *et al.*, 2005) (Πίνακας 2.7). Ακολουθεί μεταφορά των κυττάρων σε φιαλίδια eppendorf και επώαση με το διάλυμα χρώσης για τουλάχιστον 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, για τη διάσπαση τυχόν συσσωματωμάτων, το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρεται βίαια με τη χρήση σύριγγας σε ειδικά φιαλίδια και διέρχεται από τη συσκευή της κυτταρομετρίας ροής.

Πίνακας 2.7 Διάλυμα χρώσης γενετικού υλικού

Διαλύματα	Συγκέντρωση
PI (4 mg/mL)	50 μg/mL
Tris-HCl (1 M)	10 mM
$MgCl_2$ (1 M)	5 mM
RNAse A (10 mg/mL)	10 μg/mL

2.9.2.2 Αξιολόγηση της Ικανότητας των Αφεψημάτων να Επάγουν την Απόπτωση σε HT29 και PC3 Κύτταρα

1η Μέθοδος: Κυτταρομετρία Ροής.

Η πορεία είναι κοινή με αυτή που περιγράφηκε στην Ενότητα 2.9.2.1. Τα αποπτωτικά κύτταρα αποκολλώνται από την επιφάνεια του τρυβλίου και απαντώνται στο υπερκείμενο της καλλιέργειας το οποίο και συλλέγεται όπως περιγράφεται παραπάνω.

2η Μέθοδος: Σήμανση του πυρήνα με την χρωστική DAPI

Επίδραση στα HT29 και PC3 με το αφέψημα Μελισσόχορτου

Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέττες (1-1000 μL), με τα αντίστοιχα tips (αποστειρωμένα)
Μηχανική πιπέττα παροχής ελεγχόμενου όγκου
Αποστειρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες (falcon tubes), χωρητικότητας 15 και 50 mL
Αποστειρωμένα σιφώνια, χωρητικότητας 5 και 10 mL
Αποστειρωμένες πιπέττες Pasteur
Πολυστυρενικά τρυβλία 6 βοθρίων, επιφάνειας 9.5 cm^2
Καλλιεργητικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, D-γλυκόζη 4.5 g/L, L-γλουταμίνη)
Διάλυμα πυροσταφυλικού νατρίου (sodium pyruvate, 100mM)
Πενικιλλίνη- στρεπτομυκίνη (penicillin- streptomycin, 100 units/mL-100 μg/mL)
Εμβρυϊκός βόειος ορός (Fetal bovine serum, FBS)

Όργανα

Υδατόλουτρο
Θάλαμος διπλής κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow) εφοδιασμένος με λυχνίες UV
Επωαστικός κλίβανος

Αναλυτική πορεία

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στις διαδικασίες που περιγράφονται παρακάτω τοποθετούνται σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 37 °C περίπου 15 min πριν τη χρήση τους.

Με την πορεία που περιγράφηκε στην Ενότητα 2.6.3, τα κύτταρα μετρώνται και διαμοιράζονται σε εξειδικευμένα πολυστυρενικά τρυβλία των 6 βοθρίων. Η πυκνότητα των κυττάρων καθορίζεται στα 5×10^5 κύτταρα/βοθρίο και για τις δυο κυτταρικές σειρές. Ακολούθως προστίθεται θρεπτικό υλικό, που αποτελείται από καλλιεργητικό υλικό DMEM με προσθήκη 10 % FBS, 1 % διαλύματος πυροσταφυλικού νατρίου, 100 U/mL πενικιλλίνης και 100 μg/mL στρεπτομυκίνης, μέχρι τελικού όγκου 3 mL. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων για 24 h σε επωαστικό κλίβανο (συνθήκες: 37 °C, 5 % CO_2, 95 % υγρασία) ώστε να επιτευχθεί η προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια των βοθρίων. Μετά το πέρας των 24 h, το θρεπτικό υλικό ανανεώνεται και πραγματοποιείται η επίδραση με το διάλυμα του αφυδατωμένου αφεψήματος Μελισσόχορτου σε συγκέντρωση 1 μg/μL. Τέλος, η καλλιέργεια μεταφέρεται σε επωαστικό κλίβανο (συνθήκες: 37 °C, 5 % CO_2, 95 % υγρασία). Η επίδραση του αφεψήματος στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό εκτιμήθηκε ύστερα από 48 h επώασης.

Σήμανση των καρκινικών κυττάρων

Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέττες (100-1000 μL), με τα αντίστοιχα tips
Δοκιμαστικοί σωλήνες (falcon tubes), χωρητικότητας 15 mL
Φιαλίδια eppendorf, χωρητικότητας 1.5 mL
Αποστειρωμένες πιπέττες Pasteur
Αντικειμενοφόρες πλάκες με εσμυρισμένο περιθώριο, διαστάσεων 7.6 × 2.6 cm
Καλυπτρίδες διαστάσεων 1.8 × 1.8 cm
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate-buffered saline, PBS)
Διάλυμα θρυψίνης-EDTA (trypsin-EDTA)
Αντιδραστήριο DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole)
Διάλυμα αντιδραστηρίου DAPI 14.3 mM
Διάλυμα εγκλεισμού (Mounting medium)
Μεθανόλη (MeOH) αναλυτικής καθαρότητας

Όργανα

Υδατόλουτρο
Ψυχόμενη φυγόκεντρος (eppendorf centrifuge 5810 R)
Μικροσκόπιο ορατού συνδεδεμένο με ψηφιακή κάμερα λήψης εικόνων / βίντεο Zeiss Axioplan 2

Αρχή μεθόδου

Το αντιδραστήριο DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole) αποτελεί μια φθορίζουσα χρωστική, η οποία βρίσκει ευρεία εφαρμογή στη σήμανση του γενετικού υλικού (DNA). Συγκεκριμένα, έχει την ικανότητα να συνδέεται ισχυρά με το DNA σε περιοχές οι οποίες είναι άφθονες σε ζεύγη A-T. Το μόριο αυτό έχει την ικανότητα να διαπερνά τη μεμβράνη των κυττάρων για αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο σε ζωντανά, όσο και σε μονιμοποιημένα κύτταρα σημαίνοντας το γενετικό τους υλικό και κατ' επέκταση τον πυρήνα τους.

Αναλυτική πορεία

Αρχικά, το θρεπτικό υλικό (3 mL) συλλέγεται σε δοκιμαστικό σωλήνα. Στη συνέχεια, τα κύτταρα πλένονται με 1 mL διαλύματος PBS και ακολούθως προστίθεται στην καλλιέργεια 0.5 mL διαλύματος θρυψίνης ώστε να αποκολληθούν από την επιφάνεια του τρυβλίου (επώαση 5 min). Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, τα κύτταρα μεταφέρονται στο δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει το θρεπτικό υλικό. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε συνθήκες 500 g, 5 min, 20 °C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 75 μL διαλύματος PBS που περιέχει DAPI σε τελική συγκέντρωση 1 μg/ml. Ακολουθεί επώαση 20 min σε συνθήκες σκότους. Μετά την ολοκλήρωση του χρόνου επώασης, 20 μL του εναιωρήματος τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρο πλάκα και απλώνονται ομοιόμορφα. Στο κυτταρικό επίχρισμα προστίθενται λίγες σταγόνες διαλύματος εγκλεισμού και τοποθετείται καλυπτρίδα. Τέλος, πραγματοποιείται η παρατήρηση της κατάστασης του πυρήνα των κυττάρων με τη χρήση μικροσκοπίου και λαμβάνεται εικόνα της με τη χρήση φωτογραφικής μηχανής.

2.9.2.3 Μελέτη Επίδρασης των Αφεψημάτων στα Ενδοκυτταρικά Επίπεδα Οξειδωτικού Στρες σε Κύτταρα HT29 και PC3

Η επίδραση των αφεψημάτων στα επίπεδα των δραστικών ενώσεων οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS) μελετήθηκε ύστερα από επώαση με φθορίζον αντιδραστήριο μέσω αξιολόγησης των επιπέδων φθορισμού των κυττάρων, με δυο μεθόδους: 1) ως μεμονωμένων κυττάρων, με κυτταρομετρία ροής, 2) ως συνολική καλλιέργεια, με φωτόμετρο ELISA.

1η Μέθοδος: Κυτταρομετρία Ροής.

Επίδραση στα HT29 και PC3 με τα αφεψήματα των βοτάνων

Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέττες (1-1000 μL), με τα αντίστοιχα tips (αποστειρωμένα)
Μηχανική πιπέττα παροχής ελεγχόμενου όγκου
Αποστειρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες (falcon tubes), χωρητικότητας 15 και 50 mL
Αποστειρωμένα σιφώνια, χωρητικότητας 5 και 10 mL
Αποστειρωμένες πιπέττες Pasteur
Πολυστυρενικά τρυβλία 6 βοθρίων, επιφάνειας 9.5 cm^2
Καλλιεργητικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, D-γλυκόζη 4.5 g/L, L-γλουταμίνη)
Διάλυμα πυροσταφυλικού νατρίου (sodium pyruvate, 100mM)
Πενικιλίνη- στρεπτομυκίνη (penicillin- streptomycin, 100 units/mL-100 μg/mL)
Εμβρυϊκός βόειος ορός (Fetal bovine serum, FBS)

Όργανα

Υδατόλουτρο
Θάλαμος διπλής κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow) εφοδιασμένος με λυχνίες UV
Επωαστικός κλίβανος

Αναλυτική πορεία

Η πορεία είναι κοινή για το σύνολο των βοτάνων της μελέτης. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στις διαδικασίες που περιγράφονται παρακάτω τοποθετούνται σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 37 °C περίπου 15 min πριν τη χρήση τους.

Με την πορεία που περιγράφηκε στην Ενότητα 2.6.3, τα κύτταρα μετρώνται και διαμοιράζονται σε εξειδικευμένα πολυστυρενικά τρυβλία των 6 βοθρίων. Η πυκνότητα των κυττάρων καθορίζεται στα 5×10^5 κύτταρα/βοθρίο και για τις δυο κυτταρικές σειρές. Ακολούθως προστίθεται θρεπτικό υλικό, που αποτελείται από καλλιεργητικό υλικό DMEM με προσθήκη 10 % FBS, 1 % διαλύματος πυροσταφυλικού νατρίου, 100 U/mL πενικιλλίνης και 100 μg/mL στρεπτομυκίνης, μέχρι τελικού όγκου 3 mL. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων για 24 h σε επωαστικό κλίβανο (συνθήκες: 37 °C, 5 % CO_2, 95 % υγρασία) ώστε να επιτευχθεί η προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια των βοθρίων. Μετά το πέρας των 24 h, το θρεπτικό υλικό ανανεώνεται και πραγματοποιείται η επίδραση με τα διαλύματα των αφυδατωμένων αφεψημάτων σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL. Τέλος, η καλλιέργεια μεταφέρεται σε επωαστικό κλίβανο (συνθήκες: 37 °C, 5 % CO_2, 95 % υγρασία). Η επίδραση των αφεψημάτων στα ενδοκυτταρικά επίπεδα των ROS εκτιμήθηκε ύστερα από 24 επώασης για το σύνολο των

βοτάνων, ενώ η επίδραση του αφεψήματος από Μελισσόχορτο μελετήθηκε και ύστερα από 48 h επώασης.

Έμμεση σήμανση και αξιολόγηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων των δραστικών ενώσεων οξυγόνου

Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Αυτόματες επαναλαμβανόμενες πιπέττες (10-1000 μL), με τα αντίστοιχα tips
Αποστειρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες (falcon tubes), χωρητικότητας 15 mL
Αποστειρωμένες πιπέττες Pasteur
Φιαλίδια eppendorf, χωρητικότητας 1.5 mL
Δοκιμαστικοί σωλήνες (falcon tubes), χωρητικότητας 5 mL
Αποστειρωμένες σύριγγες, χωρητικότητας 5 mL
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate-buffered saline, PBS)
Διάλυμα θρυψίνης-EDTA (trypsin-EDTA)
Απόλυτη αιθανόλη (Ethanol absolute, EtOH)
Διάλυμα DCFH-DA (2’,7’-dichlorfluorescein-diacetate σε αιθανόλη, 10 mM)
Διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου 8 M (Hydrogen peroxide, H_2O_2)
Ρέον διάλυμα κυτταρομετρητή (FACS sheath fluid)

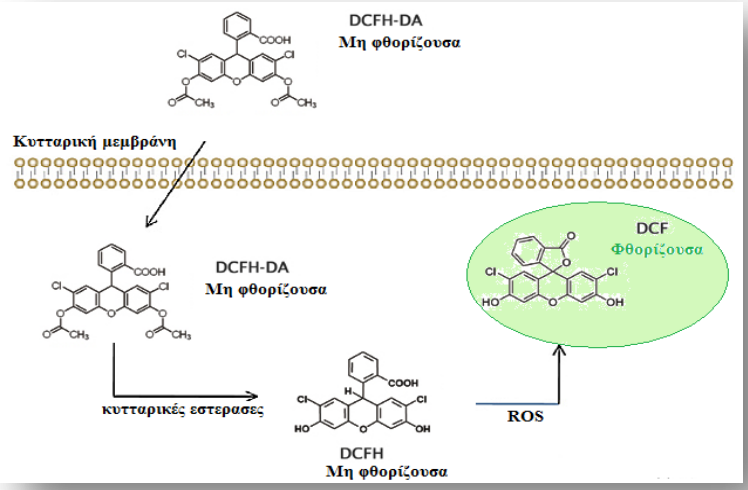
Όργανα

Υδατόλουτρο
Ψυχόμενη φυγόκεντρος (eppendorf centrifuge 5810 R)
Επωαστικός κλίβανος
Συσκευή κυτταρομετρίας ροής, FACS Calibur™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)
Λογισμικό ModFit (Verity Software House, Topsham, ME, USA)

Αρχή μεθόδου

Το αντιδραστήριο DCFH-DA (2’,7’-dichlorfluorescein-diacetate) βρίσκει ευρεία εφαρμογή στην ποσοτική αξιολόγηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων οξειδωτικού στρες κυττάρων. Η χρήση του επιτρέπει επίσης την παρακολούθηση οξειδωτικών αλλαγών που συμβαίνουν σε κύτταρα ως απάντηση σε εξω- ή ένδο- κυτταρικούς διεγέρτες, δηλαδή ουσίες που έχουν την ικανότητα να μεταβάλλουν την οξειδωτική κατάσταση των κυττάρων. Η ένωση DCFH-DA έχει την ικανότητα να διαπερνά τη μεμβράνη των κυττάρων λόγω των λιπόφιλων ιδιοτήτων που της προσδίδει η

παρουσία των οξικών ομάδων ως υποκαταστατών (πρόθεμα DA). Όταν βρεθεί εντός του κυτττάρου η ένωση αποακετυλιώνεται λόγω της δράσης ειδικών κυτταροπλασματικών εστερασών, γεγονός που καθιστά αδύνατη την επανέξοδό της. Στο εσωτερικό του κυττάρου η αλληλεπίδραση με τις δραστικές ενώσεις οξυγόνου προκαλεί τη μετατροπή της στο οξειδωμένο φθορίζον παράγωγό της (DCF) (Εικόνα 2.4). Η ένταση του φθορισμού, η οποία σχετίζεται έμμεσα με την οξειδωτική κατάσταση των κυττάρων, μπορεί να αξιολογηθεί με συνεστιακή μικροσκοπία, κυτταρομετρία ροής, φασματοφωτομετρία κ.α. (Kalyanaraman *et al.*, 2012).



Εικόνα 2.4 Έμμεση αξιολόγηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων ROS ύστερα από επώαση των κυττάρων με την ένωση DCFH-DA

Αναλυτική πορεία

Η πορεία είναι κοινή για το σύνολο των δειγμάτων και στις δυο κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν. Αρχικά, το θρεπτικό υλικό (3 mL) συλλέγεται σε δοκιμαστικό σωλήνα. Στη συνέχεια, τα κύτταρα πλένονται με 0.5 mL διαλύματος θρυψίνης-EDTA. Το διάλυμα της θρυψίνης συλλέγεται και ίσος όγκος διαλύματος προστίθεται εκ νέου στην καλλιέργεια. Ακολουθεί επώαση 5 min ώστε τα κύτταρα να αποκολληθούν από την επιφάνεια του τρυβλίου. Εν συνεχεία, τα κύτταρα μεταφέρονται στο δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει το θρεπτικό υλικό. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε συνθήκες 500 g, 5 min, 20 °C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 1 mL διαλύματος PBS. Σε επόμενο στάδιο, το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρεται σε φιαλίδια eppendorf και τοποθετείται για 30 min σε επωαστικό κλίβανο (37 °C), ύστερα από προσθήκη του διαλύματος DCFH-DA (τελική συγκέντρωση ανά δείγμα 10 μM). Εν συνεχεία, στα δείγματα που θα αποτελέσουν το θετικό μάρτυρα 10 min πριν την ολοκλήρωση της επώασης προστίθεται το διάλυμα του υπεροξειδίου του υδρογόνου (συγκέντρωση 100 μM). Τέλος, το κυτταρικό εναιώρημα υποχρεούται σε ταχεία

διέλευση μέσω σύριγγας για τη διάσπαση τυχόν συσσωματωμάτων σε ειδικά φιαλίδια και διέρχεται από τη συσκευή της κυτταρομετρίας ροής.

2η Μέθοδος: Φασματοφωτομετρικά

Επίδραση στα HT29 και PC3 με τα αφεψήματα των βοτάνων

Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέττες (1-200 μL), με τα αντίστοιχα tips (αποστειρωμένα)
Αυτόματη ρυθμιζόμενη πολυκάναλη πιπέττα (20-200 μL), με τα αντίστοιχα tips (αποστειρωμένα)
Αποστειρωμένες πιπέττες Pasteur
Πολυστυρενικά τρυβλία 96 βοθρίων κατάλληλα για φθορισμό (μαύρου χρώματος), επιφάνειας 0.32 cm^2
Καλλιεργητικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, D-γλυκόζη 4.5 g/L, L-γλουταμίνη)
Διάλυμα πυροσταφυλικού νατρίου (sodium pyruvate, 100mM)
Πενικιλλίνη- στρεπτομυκίνη (penicillin- streptomycin, 100 units/mL-100 μg/mL)
Εμβρυϊκός βόειος ορός (Fetal bovine serum, FBS)

Όργανα

Υδατόλουτρο
Θάλαμος διπλής κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow) εφοδιασμένος με λυχνίες UV
Επωαστικός κλίβανος

Αναλυτική πορεία

Η πορεία είναι κοινή για το σύνολο των βοτάνων της μελέτης. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στις διαδικασίες που περιγράφονται παρακάτω τοποθετούνται σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 37 °C περίπου 15 min πριν τη χρήση τους.

Με την πορεία που περιγράφηκε στην Ενότητα 2.6.3, τα κύτταρα μετρώνται και διαμοιράζονται σε εξειδικευμένα πολυστυρενικά τρυβλία των 96 βοθρίων. Η πυκνότητα των κυττάρων καθορίζεται στα 10^4 κύτταρα/βοθρίο και για τις δυο κυτταρικές σειρές. Ακολούθως προστίθεται θρεπτικό υλικό, που αποτελείται από καλλιεργητικό υλικό DMEM με προσθήκη 10 % FBS, 1 % διαλύματος πυροσταφυλικού νατρίου, 100 U/mL πενικιλίνης και 100 μg/mL

στρεπτομυκίνης, μέχρι τελικού όγκου 200 μL. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων για 24 h σε επωαστικό κλίβανο (συνθήκες: 37 ℃, 5 % CO_2, 95 % υγρασία) ώστε να επιτευχθεί η προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια των βοθρίων. Μετά το πέρας των 24 h, το θρεπτικό υλικό ανανεώνεται και πραγματοποιείται η επίδραση με τα διαλύματα των αφυδατωμένων αφεψημάτων σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL. Τέλος, η καλλιέργεια μεταφέρεται σε επωαστικό κλίβανο (συνθήκες: 37 ℃, 5 % CO_2, 95 % υγρασία). Η επίδραση των αφεψημάτων στα ενδοκυτταρικά επίπεδα των ROS εκτιμήθηκε ύστερα από 24 h επώασης.

Έμμεση σήμανση και αξιολόγηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων των δραστικών ενώσεων οξυγόνου

Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέττες (1-200 μL), με τα αντίστοιχα tips (αποστειρωμένα)
Αυτόματη ρυθμιζόμενη πολυκάναλη πιπέττα (20-200 μL), με τα αντίστοιχα tips (αποστειρωμένα)
Αποστειρωμένες πιπέττες Pasteur
Αποστειρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες (falcon tubes), χωρητικότητας 15 mL
Αποστειρωμένες σύριγγες, χωρητικότητας 20 mL
Αποστειρωμένα φίλτρα, διαμέτρου 0.2 μm
Απόλυτη αιθανόλη (Ethanol absolute, EtOH)
Διάλυμα DCFH-DA (2’,7’-dichlorfluorescein-diacetate σε αιθανόλη, 10 mM)
Διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου 8 M (Hydrogen peroxide, H_2O_2)
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate-buffered saline, PBS)
Διάλυμα MTT (3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide, 5 mg/mL σε PBS)
Διάλυμα διμεθυλοσουλφοξειδίου (Dimethyl sulfoxide, DMSO)

Όργανα

Υδατόλουτρο
Επωαστικός κλίβανος
Φωτόμετρο ELISA (ELISA reader)

Αναλυτική πορεία

Η πορεία είναι κοινή για το σύνολο των δειγμάτων και στις δυο κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν. Αρχικά, το θρεπτικό υλικό απομακρύνεται και τα κύτταρα πλένονται με 200 μL

ρυθμιστικού διαλύματος PBS εις διπλούν. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο απορρίπτεται και στα κύτταρα προστίθενται 150 μL διαλύματος PBS το οποίο περιέχει την ουσία DCFH-DA (τελική συγκέντρωση 10 μM). Ακολούθως, τα κύτταρα τοποθετούνται για 30 min σε επωαστικό κλίβανο (37 °C). Εν συνεχεία, στα δείγματα που θα αποτελέσουν το θετικό μάρτυρα, 10 min πριν την ολοκλήρωση της επώασης προστίθεται το διάλυμα του υπεροξειδίου του υδρογόνου (συγκέντρωση 100 μM). Μετά το πέρας του χρόνου επώασης πραγματοποιείται προσδιορισμός της έντασης φθορισμού της καλλιέργειας σε μήκος κύματος εκπομπής (λ_{em} emission) ίσο με 520 nm μετά από διέγερση (λ_{ex} excitation) στα 480 nm. Για τη διόρθωση των αποτελεσμάτων ως προς τον αριθμό των κυττάρων, μετά την ολοκλήρωση της αξιολόγησης των επιπέδων οξειδωτικού στρες πραγματοποιείται μέτρηση των κυττάρων της καλλιέργειας με τη μέθοδο MTT, όπως περιγράφεται στην Ενότητα 2.9.1.2.

2.9.2.4 Αξιολόγηση της Ικανότητας των Αφεψημάτων να Αναστέλλουν τον Κυτταρικό Πολλαπλασιασμό των HT29 και PC3 Παρουσία Αντιοξειδωτικών Μορίων

Για την εκτίμηση της ικανότητας των αφεψημάτων να επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό και τη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων μέσω μεταβολής της οξειδωτικής τους κατάστασης, ως πιθανός μηχανισμός δράσης, εφαρμόστηκε η μέθοδος που βασίζεται στην χρήση της χρωστικής ουσίας crystal violet, παρουσία του αντιοξειδωτικού μορίου N-ακετυλ- κυστεΐνη (N- acetyl cysteine, NAC). Η πορεία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στην Ενότητα 2.9.1.1, ενώ η προσθήκη του διαλύματος NAC έγινε μισή ώρα πριν τη προσθήκη των διαλυτοποιημένων αφεψημάτων των βοτάνων.

2.9.2.5 Μελέτη Επίδρασης των Αφεψημάτων στα Επίπεδα των Ενδογενών Αντιοξειδωτικών Ουσιών των HT29 και Κυττάρων PC3

Επίδραση στα HT29 και PC3 με τα αφεψήματα των βοτάνων

Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Αυτόματες ρυθμιζόμενεςπιπέττες (1-200 μL), με τα αντίστοιχα tips (αποστειρωμένα)
Μηχανική πιπέττα παροχής ελεγχόμενου όγκου
Αποστειρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες (falcon tubes), χωρητικότητας 15 και 50 mL
Αποστειρωμένα σιφώνια, χωρητικότητας 5 και 10 mL
Αποστειρωμένες πιπέττες Pasteur
Αποστειρωμένες φιάλες καλλιέργειας, επιφάνειας 75 cm^2

Καλλιεργητικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, D-γλυκόζη 4.5 g/L, L-γλουταμίνη)
Διάλυμα πυροσταφυλικού νατρίου (sodium pyruvate, 100mM)
Πενικιλλίνη- στρεπτομυκίνη (penicillin- streptomycin, 100 units/mL-100 μg/mL)
Εμβρυϊκός βόειος ορός (Fetal bovine serum, FBS)

Όργανα

Υδατόλουτρο
Θάλαμος διπλής κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow) εφοδιασμένος με λυχνίες UV
Επωαστικός κλίβανος

Αναλυτική πορεία

Η πορεία είναι κοινή για το σύνολο των βοτάνων της μελέτης και στις δυο κυτταρικές σειρές. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στις διαδικασίες που περιγράφονται παρακάτω τοποθετούνται σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 37 °C περίπου 15 min πριν τη χρήση τους.

Με την πορεία που περιγράφηκε στην Ενότητα 2.6.3, τα κύτταρα μετρώνται και διαμοιράζονται σε φιάλες καλλιέργειας. Η πυκνότητα των κυττάρων καθορίζεται στα 2.5×10^6 κύτταρα/φιάλη. Ακολούθως προστίθεται θρεπτικό υλικό, που αποτελείται από καλλιεργητικό υλικό DMEM με προσθήκη 10 % FBS, 1 % διαλύματος πυροσταφυλικού νατρίου, 100 U/mL πενικιλλίνης και 100 μg/mL στρεπτομυκίνης, μέχρι τελικού όγκου 15 mL. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων για 24 h σε επωαστικό κλίβανο (συνθήκες: 37 °C, 5 % CO_2, 95 % υγρασία) ώστε να επιτευχθεί η προσκόλλησή τους στην επιφάνεια των βοθρίων. Μετά το πέρας των 24 h, το θρεπτικό υλικό ανανεώνεται και πραγματοποιείται η επίδραση με τα διαλύματα των αφυδατωμένων αφεψημάτων σε συγκέντρωση 0.2 μg/μL. Τέλος, η καλλιέργεια μεταφέρεται σε επωαστικό κλίβανο (συνθήκες: 37 °C, 5 % CO_2, 95 % υγρασία). Η επίδραση των αφεψημάτων στα επίπεδα της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης εκτιμήθηκε ύστερα από 24 h επώασης.

Εκχύλιση και ποσοτικοποίηση ολικών πρωτεϊνών κατά Bradford

Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέττες (2-1000 μL), με τα αντίστοιχα tips (αποστειρωμένα)
Φιαλίδια eppendorf, χωρητικότητας 1.5 mL
Αποστειρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες (falcon tubes), χωρητικότητας 15 και 50 mL

Αποστειρωμένες πιπέττες Pasteur

Πολυστυρενικά τρυβλία 96 βοθρίων, επιφάνειας 0.32 cm^2

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate-buffered saline, PBS)

Διάλυμα θρυψίνης-EDTA (trypsin-EDTA)

Διάλυμα μεταφωσφορικού οξέος (meta-phosphoric acid, 5 %)

Διάλυμα χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 (Αντιδραστήριο Bradford)

Διάλυμα αλβουμίνης ορού μόσχου (Bovine serum albumin, BSA, 1 mg/mL σε PBS)

Όργανα

Υδατόλουτρο

Θάλαμος διπλής κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow) εφοδιασμένος με λυχνίες UV

Επωαστικός κλίβανος

Λουτρό υπερήχων

Φωτόμετρο ELISA (ELISA reader) SUNRISE TECAN

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση της χρωστικής «Coomassie Brilliant Blue G-250» με τις πρωτεΐνες του μίγματος δημιουργώντας ένα σταθερό χρωμοφόρο σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής. Η ένταση της απορρόφησης του μίγματος στα 595 nm σχετίζεται άμεσα με τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών.

Αναλυτική πορεία

Η πορεία είναι κοινή για το σύνολο των δειγμάτων και στις δυο κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν. Αρχικά, το υπερκείμενο της καλλιέργειας απορρίπτεται και προστίθενται 5 mL διαλύματος PBS ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα ορού. Ακολουθεί προσθήκη 3 mL διαλύματος θρυψίνης και επώαση για τουλάχιστον 5 min, ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα από την επιφάνεια της φιάλης. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, τα κύτταρα μεταφέρονται σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 5 mL θρεπτικό υλικό. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε συνθήκες 500 g, 5 min, 20 °C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 1 mL διαλύματος PBS. Ακολουθεί εκ νέου φυγοκέντρηση, απόρριψη του υπερκειμένου και επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος σε 2.5 mL διαλύματος μεταφωσφορικού οξέος. Στη συνέχεια, προκειμένου να επιτευχθεί λύση των κυττάρων, τα δείγματα μεταφέρονται σε λουτρό υπερήχων, όπου και επωάζονται για 5 min. Το κυτταρικό

εκχύλισμα μεταφέρεται σε φιαλίδια eppendorf μετά από φυγοκέντρηση (συνθήκες: 10000 g, 10 min, 4 °C) και ακολουθεί ποσοτική αξιολόγηση των ολικών πρωτεϊνών. Για το σκοπό αυτό, 250 μL/βοθρίο αντιδραστηρίου Bradford μεταφέρονται σε πολυστυρενικό τρυβλίο 96 θέσεων. Στο διάλυμα προστίθενται 5 μL κυτταρικού εκχυλίσματος και το μίγμα επωάζεται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης πραγματοποιείται μέτρηση της απορρόφησης στα 595 nm. Για την έκφραση των αποτελεσμάτων σε μg/ mL, κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς αλβουμίνης, όπως περιγράφεται παρακάτω.

Πρότυπη καμπύλη αναφοράς αλβουμίνης

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης παρασκευάζονται διαλύματα αλβουμίνης σε συγκεντρώσεις 1, 2, 4, 8 και 10 μg/mL από μητρικό διάλυμα συγκέντρωσης 1 mg/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 x αποδίδονται οι τιμές της απορρόφησης στα 595 nm και στον άξονα των y αποδίδονται οι τιμές συγκέντρωσης αλβουμίνης σε μg/mL.

Μέτρηση των επιπέδων της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης (GSH)

Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

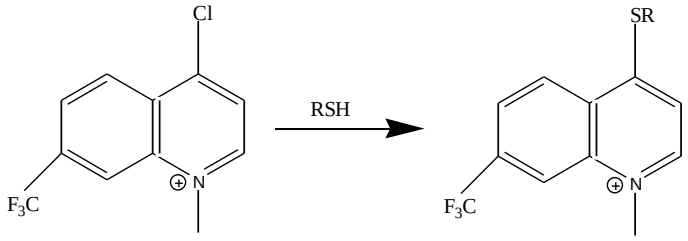
Αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέττες (20-200 μL), με τα αντίστοιχα tips
Πολυστυρενικά τρυβλία 96 βοθρίων, επιφάνειας 0.32 cm^2
Εξειδικευμένο ELISA kit για τη μέτρηση της GSH
Διάλυμα γλουταθειόνης (200 mM)

Όργανα

Φωτόμετρο ELISA (ELISA reader) SUNRISE TECAN

Αρχή μεθόδου

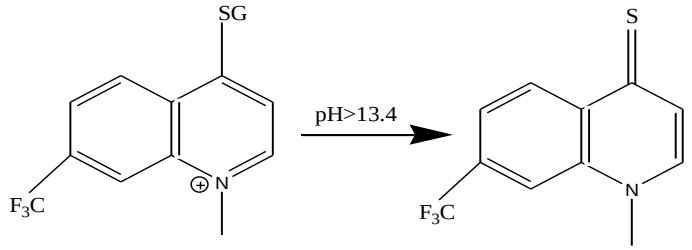
Η μέθοδος βασίζεται στο σχηματισμό έγχρωμης ένωσης θειόνης η οποία απορροφά στα 400 nm, η συγκέντρωση της οποίας είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της γλουταθειόνης. Αρχικά, προστίθεται η έγχρωμη ένωση (4-chloro-1-methyl-7-trifluoromethylquinolinium methylsulfate) με αποτέλεσμα το σχηματισμό θειοαιθέρων έχοντας ως υπόστρωμα το σύνολο των θειολών που είναι παρούσες στο δείγμα σύμφωνα με την αντίδραση (1).



(1)

Χρωμογόνο Θειοαιθέρας

Η ακόλουθη προσθήκη βασικού διαλύματος (pH> 13), οδηγεί στη μετατροπή των θειοαιθέρων της γλουταθειόνης προς σχηματισμό θειονών σύμφωνα με την αντίδραση (2).



(2)

Θειοαιθέρας γλουταθειόνης Θειόνη

<u>Αναλυτική πορεία</u>

Τα επίπεδα της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης σε κυτταρικό εκχύλισμα μετρώνται σε φωτόμετρο ELISA με χρήση εξειδικευμένου kit, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρίας. Αρχικά προετοιμάζονται τα αντιδραστήρια και τα πρότυπα που θα χρησιμοποιηθούν σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Στις αντίστοιχες θέσεις στο πολυστυρενικό τρυβλίο των 96 βοθρίων προστίθενται 100 μL δείγματος και στη συνέχεια προστίθενται 50 μL χρωμογόνου και 50 μL βασικού διαλύματος. Τέλος, ύστερα από επώαση 30 min, σε θερμοκρασία δωματίου υπό σκοτάδι, πραγματοποιείται μέτρηση της απορρόφησης στα 400 nm. Για την έκφραση των αποτελεσμάτων σε mM, κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς GSH, όπως περιγράφεται παρακάτω.

<u>Πρότυπη καμπύλη αναφοράς γλουταθειόνης</u>

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης παρασκευάζονται διαλύματα GSH σε συγκεντρώσεις 10, 20, 40, 80, 100 και 150 mM από μητρικό διάλυμα συγκέντρωσης 200 mM. 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 x αποδίδονται οι τιμές της απορρόφησης στα 400 nm και στον άξονα των y αποδίδονται οι τιμές συγκέντρωσης GSH σε mM.

2.9.2.6 Μελέτη Επίδρασης των Αφεψημάτων στα Επίπεδα Ενεργοποίησης Μεταγραφικών Παραγόντων των Κυττάρων HT29 και PC3

Επίδραση στα HT29 και PC3 με τα αφεψήματα των βοτάνων

Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Αυτόματες ρυθμιζόμενεςπιπέττες (1-1000 μL), με τα αντίστοιχα tips (αποστειρωμένα)
Μηχανική πιπέττα παροχής ελεγχόμενου όγκου
Αποστειρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες (falcon tubes), χωρητικότητας 15 και 50 mL
Αποστειρωμένα σιφώνια, χωρητικότητας 5 και 10 mL
Αποστειρωμένες πιπέττες Pasteur
Αποστειρωμένα πολυστυρενικά τρυβλία 12 βοθρίων, επιφάνειας 3.8 cm^2
Καλλιεργητικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, D-γλυκόζη 4.5 g/L, L-γλουταμίνη)
Διάλυμα πυροσταφυλικού νατρίου (sodium pyruvate, 100mM)
Πενικιλλίνη- στρεπτομυκίνη (penicillin- streptomycin, 100 units/mL-100 μg/mL)
Εμβρυϊκός βόειος ορός (Fetal bovine serum, FBS)

Όργανα

Υδατόλουτρο
Θάλαμος διπλής κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow) εφοδιασμένος με λυχνίες UV
Επωαστικός κλίβανος

Αναλυτική πορεία

Η πορεία είναι κοινή για το σύνολο των βοτάνων της μελέτης και στις δυο κυτταρικές σειρές. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στις διαδικασίες που περιγράφονται παρακάτω τοποθετούνται σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 37 °C περίπου 15 min πριν τη χρήση τους.

Με την πορεία που περιγράφηκε στην Ενότητα 2.6.3, τα κύτταρα μετρώνται και διαμοιράζονται σε εξειδικευμένα πολυστυρενικά τρυβλία των 12 βοθρίων. Η πυκνότητα των κυττάρων καθορίζεται στα 10^5 κύτταρα/βοθρίο. Ακολούθως προστίθεται θρεπτικό υλικό, που αποτελείται από καλλιεργητικό υλικό DMEM με προσθήκη 10 % FBS, 1 % διαλύματος πυροσταφυλικού νατρίου, 100 U/mL πενικιλλίνης και 100 μg/mL στρεπτομυκίνης, μέχρι τελικού όγκου 2 μL. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων για 24 h σε επωαστικό κλίβανο

(συνθήκες: 37 °C, 5 % CO_2, 95 % υγρασία) ώστε να επιτευχθεί η προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια των βοθρίων. Μετά το πέρας των 24 h, το θρεπτικό υλικό ανανεώνεται και πραγματοποιείται η επίδραση με τα διαλύματα των αφυδατωμένων αφεψημάτων σε συγκέντρωση 0.2 μg/μL. Τέλος, η καλλιέργεια μεταφέρεται σε επωαστικό κλίβανο (συνθήκες: 37 °C, 5 % CO_2, 95 % υγρασία). Η επίδραση των αφεψημάτων στα επίπεδα ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα Πυρηνικός Παράγοντας-κΒ (Nuclear Factor-kappaB, NF-κB) εκτιμήθηκε ύστερα από 24 h επώασης.

Διέγερση των Κυττάρων HT29 και PC3 με TNF-α- Μοντέλο φλεγμονής

Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Αυτόματες ρυθμιζόμενεςπιπέττες (1-1000 μL), με τα αντίστοιχα tips (αποστειρωμένα)
Μηχανική πιπέττα παροχής ελεγχόμενου όγκου
Αποστειρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες (falcon tubes), χωρητικότητας 15 και 50 mL
Αποστειρωμένα σιφώνια, χωρητικότητας 5 και 10 mL
Αποστειρωμένες πιπέττες Pasteur
Καλλιεργητικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, D-γλυκόζη 4.5 g/L, L-γλουταμίνη)
Διάλυμα πυροσταφυλικού νατρίου (sodium pyruvate, 100mM)
Πενικιλλίνη- στρεπτομυκίνη (penicillin- streptomycin, 100 units/mL-100 μg/mL)
Εμβρυϊκός βόειος ορός (Fetal bovine serum, FBS)
Διάλυμα Παράγοντα Νέκρωσης Όγκων (Tumor Necrosis Factor-alpha, TNF-α, 100 μg/mL)

Όργανα

Υδατόλουτρο
Θάλαμος διπλής κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow) εφοδιασμένος με λυχνίες UV
Επωαστικός κλίβανος

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στην παρουσία υποδοχέα TNF-α (TNF υποδοχέας τύπου 1) στην πλασματική μεμβράνη των περισσοτέρων ιστικών κυττάρων. Η σύνδεση της συγκεκριμένης κυτταροκίνης στον υποδοχέα της πυροδοτεί έναν σηματοδοτικό καταρράκτη με αποτέλεσμα την εκκίνηση διαδικασιών που σχετίζονται με την κυτταρική επιβίωση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη φλεγμονώδη αντίδραση και άλλες. Η παρουσία του TNF-α σε κυτταρική

καλλιέργεια, διεγείρει τα κύτταρα, προσομοιώνοντας ένα μοντέλο φλεγμονής, με επακόλουθο την εκκίνηση όλων των προαναφερθεισών διαδικασιών.

Αναλυτική πορεία

Η πορεία είναι κοινή για το σύνολο των δειγμάτων και στις δυο κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν. Αρχικά, το υπερκείμενο της καλλιέργειας απορρίπτεται και προστίθεται 1 mL θρεπτικού υλικού. Στη συνέχεια, προστίθεται στην καλλιέργεια των κυττάρων διάλυμα TNF-α τελικής συγκέντρωσης 50 ng/mL. Η πρόκληση του μοντέλου φλεγμονής και η επίδραση των αφεψημάτων αξιολογούνται συναρτήσει μη διεγερμένων κυττάρων έπειτα από επώαση των κυττάρων για 24 h σε επωαστικό κλίβανο (συνθήκες: 37 °C, 5 % CO_2, 95 % υγρασία).

Μέτρηση των επιπέδων ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα Πυρηνικού Παράγοντα-κΒ (Nuclear Factor-kappaB, NF-κB)

Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Αυτόματες ρυθμιζόμενεςπιπέττες (20-200 μL), με τα αντίστοιχα tips
Φιαλίδια eppendorf, χωρητικότητας 1.5 mL
Εργαλεία απόξεσης κυττάρων (cell scrapers)
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate-buffered saline, PBS)
Διάλυμα λύσης κυττάρων (cell lysis buffer)
Εξειδικευμένο ELISA kit για τη μέτρηση του NF-κB p65
Διάλυμα αναστολέα πρωτεασών (Phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF, 1mM)

Όργανα

Λουτρό υπερήχων
Φωτόμετρο ELISA (ELISA reader) SUNRISE TECAN

Αρχή μεθόδου

Μετά τη λύση των κυττάρων, η πρωτεΐνη Phospho-NF-κB p65 προσδένεται αρχικά σε μονοκλωνικό αντίσωμα (Phospho-NF-kB p65 Mouse mAb). Στη συνέχεια, μετά από πλύσιμο για απομάκρυνση άλλων πρωτεϊνών, προστίθεται πολυκλωνικό αντίσωμα ανιχνευτής συζευγμένο με υπεροξειδάση (NF-kB p65 Rabbit mAb) της προσδεδεμένης πρωτεΐνης στο μονοκλωνικό αντίσωμα. Ακολούθως, προστίθεται χρωμογόνο υπόστρωμα, με αποτέλεσμα να λαμβάνει χώρα χρωματομετρική αντίδραση. Η ένταση της απορρόφησης του διαλύματος, η

οποία σχετίζεται άμεσα με την συγκέντρωση της Phospho-NF-κB p65 στο αρχικό δείγμα, αξιολογείται στα 450 nm.

Αναλυτική πορεία

Αρχικά, τα προσκολλημένα κύτταρα στην επιφάνεια του βοθρίου πλένονται με παγωμένο διάλυμα PBS και στη συνέχεια προστίθενται 200 μL διαλύματος λύσης των κυττάρων (cell lysis buffer), το οποίο περιέχει διάλυμα αναστολέα πρωτεασών. Ύστερα από επώαση 5 min σε πάγο, τα κύτταρα αποκολλώνται από την επιφάνεια το βοθρίου με τη χρήση εργαλείου απόξεσης κυττάρων. Ακολούθως, το κυτταρικό εκχύλισμα μεταφέρεται σε φιαλίδια eppendorf , τα οποία τοποθετούνται σε λουτρό υπερήχων, ώστε να επιτευχθεί η πλήρης λύση των κυττάρων. Το υπερκείμενο διάλυμα που περιέχει τις πρωτεΐνες απομονώνεται ύστερα από φυγοκέντρηση (συνθήκες: 10000g, 10 min, 4 ℃), μεταφέρεται σε φιαλίδια eppendorf και αποθηκεύεται στους -80 ℃.

Για την αξιολόγηση της ενεργοποίησης του NF-κB μετρώνται τα επίπεδα της πρόδρομης πρωτεΐνης (NF-κB) p65 ύστερα από ποσοτικοποίηση των ολικών πρωτεϊνών του κυτταρικού εκχυλίσματος, όπως περιγράφεται στην Ενότητα 2.9.2.4. Τα επίπεδα της p65 μετρώνται σε φωτόμετρο ELISA με την εφαρμογή εξειδικευμένου kit και σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρίας. Η αναλυτική πορεία είναι αντίστοιχη με αυτή που περιγράφεται στην Ενότητα 2.8.2.

2.9.3 Μελέτη Αντιφλεγμονώδους Δράσης των Αφεψημάτων

2.9.3.1 Μελέτη της Επίδρασης των Αφεψημάτων στα Επίπεδα Προφλεγμονωδών Κυτταροκινών

Η διέγερση των κυττάρων και η επίδραση με τα διαλυτοποιημένα αφεψήματα των βοτάνων είναι κοινή με αυτή που περιγράφεται στην Ενότητα 2.9.2.6.

Μέτρηση των επιπέδων της Ιντερλευκίνη- 8 (Interleukin-8, IL-8)

Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Αυτόματη πιπέττα (100-1000 μL), με τα αντίστοιχα tips
Αυτόματη ρυθμιζόμενηπολυκάναλη πιπέττα (20-200 μL), με τα αντίστοιχα tips
Αποστειρωμένα φιαλίδια eppendorf, χωρητικότητας 1.5 mL
Εξειδικευμένο ELISA kit για τη μέτρηση της IL-8

Όργανα

Ψυχόμενη φυγόκεντρος (eppendorf centrifuge 5810 R)
Φωτόμετρο ELISA (ELISA reader) SUNRISE TECAN

Αρχή μεθόδου

Η κυτταροκίνη (IL-8) προσδένεται αρχικά σε μονοκλωνικό αντίσωμα anti-IL-8, ενώ στη συνέχεια για τον ανοσοπροσδιορισμό προστίθεται πολυκλωνικό αντίσωμα ανιχνευτής της προσδεδεμένης κυτταροκίνης στο μονοκλωνικό αντίσωμα. Μετά από πλύση για την απομάκρυνση άλλων πρωτεϊνών, προστίθεται υπόστρωμα και λαμβάνει χώρα χρωματομετρική αντίδραση. Το προϊόν της αντίδρασης απορροφά στα 450 nm.

Αναλυτική πορεία

Το υπερκείμενο διάλυμα της καλλιέργεια των κυττάρων που περιέχει τις πρωτεΐνες απομονώνεται ύστερα από φυγοκέντρηση (συνθήκες: 10000g, 10 min, 4 °C) ώστε να απομακρυνθούν τυχόν αποπτωτικά κύτταρα ή προϊόντα λύσης κυττάρων, μεταφέρεται σε φιαλίδια eppendorf και αποθηκεύεται στους -80 °C.

Η αξιολόγηση των επιπέδων της IL-8 πραγματοποιείται ύστερα από ποσοτικοποίηση των ολικών πρωτεϊνών του κυτταρικού εκχυλίσματος, όπως περιγράφεται στην Ενότητα 2.9.2.4. Τα επίπεδα της IL-8 μετρώνται σε φωτόμετρο ELISA με εφαρμογή εξειδικευμένου kit και σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρίας. Η αναλυτική πορεία είναι αντίστοιχη με αυτή που περιγράφεται στην Ενότητα 2.8.2. Για την έκφραση των αποτελεσμάτων σε pg/mL, κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς IL-8 όπως περιγράφεται στην Ενότητα 2.8.2.

2.10 Στατιστική Επεξεργασία

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS, version 20.00 (SPSS Inc, Chicago, IL). Λόγω της κανονικής κατανομής του πληθυσμού (Kolmogorov-Smirnov test), οι συγκρίσεις ανά ζεύγη έγιναν με ανάλυση διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (one-way ANOVA) χρησιμοποιώντας το Tukey test (≥7 ομάδες σύγκρισης) ή το Bonferroni test (≤7 ομάδες σύγκρισης). Για τον προσδιορισμό του βαθμού συσχέτισης εφαρμόστηκε το υπολογιστικό πρόγραμμα Analysis Toolpak του Microsoft excel (Microsoft Office version 2013) με *13-2=11* Βαθμούς Ελευθερίας και *P-value* = 0.05 ως το επίπεδο στατιστικώς σημαντικής διαφοράς.

ΚΕΦΆΛΑΙΟ ΙΙΙ : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διατριβή αξιολογήθηκαν οι αντιοξειδωτικές και βιολογικές δράσεις που επιδεικνύουν τα αφεψήματα 13 βοτάνων της Ελληνικής χλωρίδας εφαρμόζοντας *in vitro* πειραματικές δοκιμές. Τα βότανα της μελέτης ήταν τα ακόλουθα: Αντωναΐδα (*Origanum microphyllum*), Δενδρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*), Δίκταμο (*Origanum dictamnus*), Θρύμπα (*Satureja thymbra*), Θυμάρι (*Thymus vulgaris*), Μαντζουράνα (*Origanum majorana*), Μελισσόχορτο (*Melissa officinalis*), Ρίγανη (*Origanum vulgare*), Σπαθόχορτο (*Hypericum perforatum*), Τσάι βουνού ή Σιδερίτης (*Sideritis syriaca*), Φασκόμηλο (*Salvia officinalis*), Φλισκούνι (*Mentha pulegium*) και Χαμομήλι (*Matricaria chamomilla*). Οι λόγοι που οδήγησαν στην επιλογή των προαναφερθέντων βοτάνων ήταν οι καταπραϋντικές τους ιδιότητες, γνωστές από την αρχαιότητα, το γεγονός ότι είναι ευρέως διαδεδομένα στον Ελλαδικό χώρο, η ενδεχόμενη καθημερινή τους κατανάλωση σε ποικίλες μορφές, και η ταυτότητα μερικών εξ αυτών ως «Ελληνικών» φυτών, καθώς είναι ενδημικά της χώρας. Επιλέχθηκε να διερευνηθούν οι δράσεις των βοτάνων υπό μορφή αφεψημάτων, καθώς αυτά αποτελούν μια κοινή διατροφική προσέγγιση για τον απλό καταναλωτή, ο οποίος αναζητά μέσα για τη βελτίωση της ζωής και της υγείας του. Πριν γίνει ο έλεγχος των δραστικοτήτων που αποτέλεσαν αντικείμενο της μελέτης, προσδιορίσθηκε η περιεκτικότητα των αφεψημάτων σε επιλεγμένες κατηγορίες φυτοχημικών.

3.1 Χημικές Αναλύσεις

Η παρασκευή των αφεψημάτων έγινε (Ενότητα 2.2) σύμφωνα με τον παραδοσιακό τρόπο προετοιμασίας στην Ελλάδα. Ακολούθησε λυοφιλίωση των αφεψημάτων και παραλαβή του στερεού υπολείμματος. Οι αποδόσεις των βοτάνων σε στερεό υπόλειμμα παρατίθενται στον Πίνακα 3.1, και τα δεδομένα του οποίου χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για να εκφραστούν τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων «ανά κούπα», όπου 1 κούπα αντιστοιχεί σε 200mL.

Πίνακας 3.1 Απόδοση των αφεψημάτων της μελέτης σε στερεό υπόλειμμα σε mg ανά κούπα* (μ. όροι± s.d τριών προσδιορισμών)

A1	A2	A3	A4	A5	A6
368.1±13.1	72.7±6.3	360.0±11.2	436.0±19.3	441.9±20.4	496.2±18.5

Πίνακας 3.1 (Συνέχεια)

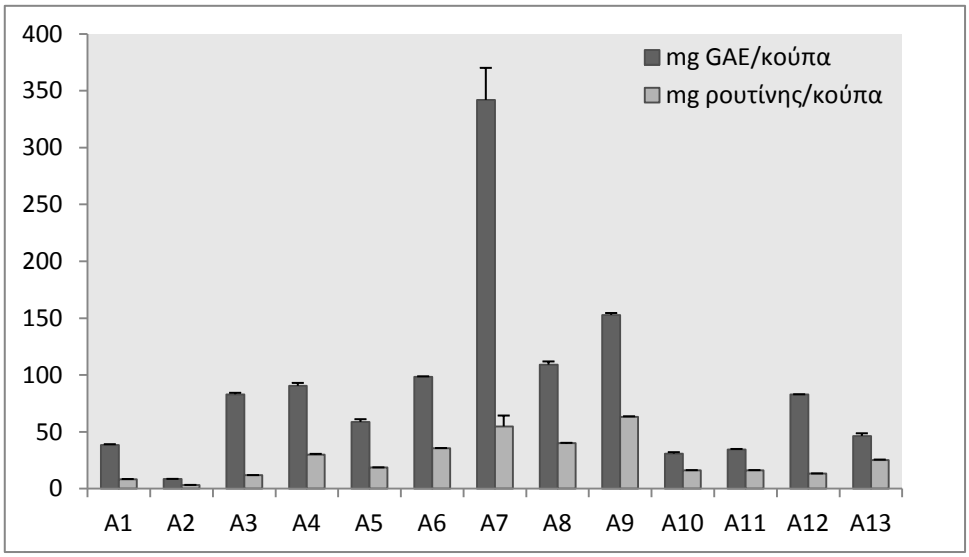
A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13
904.3±23	572.7±28.6	624.7±25.7	342.7±12.3	182.7±16.3	402.7±14.5	662.7±23.4

*Όπου A1: Αντωναΐδα, A2: Δενδρολίβανο, A3: Δίκταμο, A4: Θρύμπα, A5: Θυμάρι, A6: Μαντζουράνα, A7: Μελισσόχορτο, A8: Ρίγανη, A9: Σπαθόχορτο, A10: Τσάι βουνού, A11: Φασκόμηλο, A12: Φλισκούνι, A13: Χαμομήλι, *κούπα: 200 mL

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 3.1, προκύπτει ότι το Δενδρολίβανο απέδωσε τα λιγότερα εκχυλίσιμα συστατικά (ποσοτικά), με 72.7±6.3 mg ανά κούπα, ενώ το Μελισσόχορτο έδωσε την υψηλότερη ποσότητα στερεού υπολείμματος, 904.3 mg ανά κούπα ροφήματος. Από τα βότανα της μελέτης ξεχώρισαν επίσης το Χαμομήλι (662.7mg/κούπα) και το Σπαθόχορτο (624.7mg/κούπα), ενώ τα υπόλοιπα αφεψήματα απέδωσαν συγκριτικά παρόμοιες τιμές στερεού υπολείμματος.

3.1.1 Συνολικό Φαινολικό Περιεχόμενο των Αφεψημάτων

Δεδομένου ότι οι δράσεις που επιδεικνύουν τα αρωματικά/ φαρμακευτικά φυτά και βότανα αποδίδονται σε μεγάλο βαθμό στην παρουσία φαινολικών συστατικών, κρίθηκε απαραίτητη η μελέτη της ποσοτικής και ποιοτικής σύστασης των αφεψημάτων σε αυτές τις κατηγορίες φυτοχημικών. Αρχικά, προσδιορίσθηκαν τα ολικά φαινολικά συστατικά και οι ολικές φλαβανόλες μια κατηγορίας πολυφαινολικών συστατικών (φλαβονοειδή), που επιδεικνύουν σημαντικές βιολογικές δράσεις και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3.1.



*Όπου Α1: Αντωναΐδα, Α2: Δενδρολίβανο, Α3: Δίκταμο, Α4: Θρύμπα, Α5: Θυμάρι, Α6: Μαντζουράνα, Α7: Μελισσόχορτο, Α8: Ρίγανη, Α9: Σπαθόχορτο, Α10: Τσάι βουνού, Α11: Φασκόμηλο, Α12: Φλισκούνι, Α13: Χαμομήλι, *κούπα: 200 mL

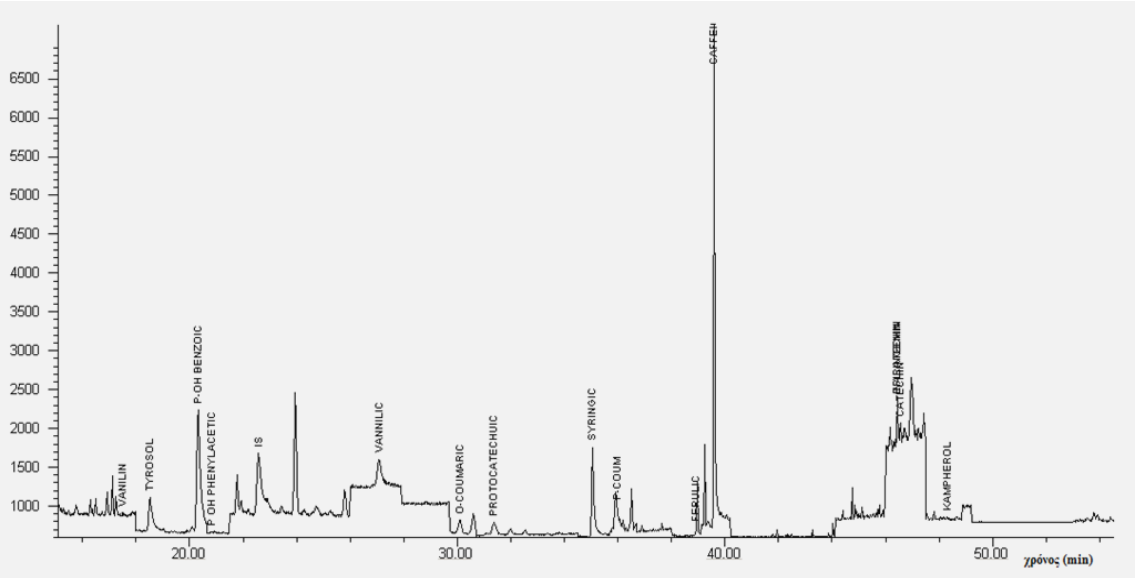
Διάγραμμα 3.1 Περιεχόμενο των αφεψημάτων σε ολικά φαινολικά συστατικά και φλαβανόλες, εκφρασμένα σε mg ισοδύναμων γαλλικού οξέος (gallic acid equivalents, GAE) και mg ισοδύναμων ρουτίνης ανά κούπα, αντίστοιχα (μ. όροι± s.d τριών προσδιορισμών)

Οι τιμές των ολικών φαινολικών συστατικών των αφεψημάτων κυμάνθηκαν μεταξύ 8.5-341.9 mg GAE/κούπα. Τα αφεψήματα, κατατάσσονται κατά η σειρά αυξανόμενης περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά συστατικά, ως ακολούθως: Δενδρολίβανο < Τσάι βουνού < Φασκόμηλο < Αντωναΐδα < Χαμομήλι < Θυμάρι < Φλισκούνι < Δίκταμο < Θρύμπα <

Μαντζουράνα < Ρίγανη < Σπαθόχορτο < Μελισσόχορτο. Στο Διάγραμμα 3.1 παρουσιάζονται επίσης οι συγκεντρώσεις ολικών φλαβανολών στα αφεψήματα των βοτάνων της μελέτης, οι οποίες κυμάνθηκαν μεταξύ 3.2-63.2 mg ρουτίνης/κούπα. Η υψηλότερη συγκέντρωση ολικών φλαβανολών βρέθηκε στο αφέψημα Σπαθόχορτου, 63.2±0.45 mg ρουτίνης/κούπα, ενώ οι χαμηλότερες στα αφεψήματα Δενδρολίβανου και Αντωναΐδας (3.2±0.10 και 8.3±0.22 mg ρουτίνης/κούπα, αντίστοιχα).

3.1.2 Προσδιορισμός Απλών Φαινολικών Συστατικών και Τερπενίων στα Αφεψήματα

Για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών των αφεψημάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αέριας χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματοσκοπία μάζας (GC-MS). Τα αποτελέσματα των αναλύσεων παρουσιάζονται στους Πίνακες 3.2Α και 3.2Β και καταδεικνύουν τα διαφορετικά προφίλ φαινολικών και τερπενικών συστατικών των αφεψημάτων της μελέτης. Στο σύνολο των δειγμάτων προσδιορίστηκαν 27 φαινολικά συστατικά, 2 τερπενικά οξέα και 2 τερπενοειδείς φαινόλες. Στην Εικόνα 3.1 παρουσιάζεται ενδεικτικό αεριοχρωματογράφημα του αφεψήματος Αντωναΐδας, που προέκυψε από την εφαρμογή της μεθόδου SIM στον αέριο χρωματογράφο-φασματογράφο μάζας (GC-MS). Σημειώνεται ότι οι τερπενοειδείς φαινόλες καρβακρόλη και θυμόλη, προσδιορίσθηκαν με μέθοδο SCAN GC-MS, που καταγράφει το σύνολο των ιόντων (Total Ion Current, TIC), και για την ποσοτικοποίησή τους χρησιμοποιήθηκε η καμπύλη αναφοράς της θυμόλης.



Εικόνα 3.1 Αεροχρωματογράφημα GC-MS με εφαρμογή της μεθόδου SIM του αφεψήματος Αντωναΐδας (Α1)

Στο αφέψημα της Αντωναΐδας οι τερπενοειδείς φαινόλες καρβακρόλη και θυμόλη ήταν τα κυρίαρχα συστατικά, αποτελώντας περί το 98 % του συνόλου των συστατικών που

προσδιορίσθηκαν, ακολουθούμενες από το συριγγικό οξύ (υδροξυ-βενζοϊκό οξύ), το καφεϊκό οξύ (υδροξυ-κινναμωμικό οξύ) και το φλαβονοειδές, ναριγκενίνη. Σημαντικό είναι να τονιστεί η απουσία του ροσμαρινικού οξέος από το αφέψημα της Αντωναΐδας. Το συγκεκριμένο υδροξυ-κινναμωμικό οξύ ταυτοποιήθηκε σε έντεκα, από τα δεκατρία βότανα της μελέτης (πλην Αντωναΐδας και Σπαθόχορτου), αποτελώντας ταυτόχρονα την κυριότερη δομή που ανιχνεύτηκε και στο αφέψημα του Μελισσόχορτου (περίπου το 88 % του συνόλου). Σημαντική ήταν η παρουσία του ροσμαρινικού οξέος και στο αφέψημα από Δενδρολίβανο, στο οποίο ανιχνεύτηκε και καρβακόλη σε αρκετά μεγάλο ποσοστό, ωστόσο στο συγκεκριμένο αφέψημα καταγράφηκε η μικρότερη ποσότητα απλών φαινολικών συστατικών ανά κούπα (1199.9±129.9 μg/κούπα). Τα ίδια χαρακτηριστικά παρουσίασε και το αφέψημα από Δίκταμο, ενώ στα αφεψήματα από Θρύμπα, Θυμάρι και Μαντζουράνα οι τερπενοειδείς φαινόλες θυμόλη και καρβακρόλη κυριάρχησαν με μεγάλα ποσοστά του συνόλου (> 95 %). Επιπρόσθετα, το αφέψημα από Θυμάρι βρέθηκε το πιο πλούσιο σε φαινολικά συστατικά, καθώς στο σύνολό τους ανιχνεύτηκαν 270581.0±8989.0 μg/κούπα αφεψήματος, ενώ στο αφέψημα από Μαντζουράνα καταγράφηκε η μεγαλύτερη συγκέντρωση φερουλικού οξέος (80.3±2.5 μg/κούπα). Τα αφεψήματα Μελισσόχορτου και Ρίγανης χαρακτηρίσθηκαν από την έντονη παρουσία υδροξυ-κινναμωμικών οξέων, ενώ περιείχαν επίσης σημαντικές ποσότητες φλαβονοειδών και τερπενοειδών φαινολών, αντίστοιχα. Το αφέψημα Σπαθόχορτου, πέρα από την απουσία ροσμαρινικού οξέος, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, χαρακτηρίσθηκε από σημαντικές ποσότητες φλαβονοειδών που περιέχει και ειδικότερα επικατεχίνης (29275.4±1240.9 μg/κούπα). Σημειώνεται ότι η υψηλή περιεκτικότητα του αφεψήματος αυτού σε φαινολικά συστατικά επιβεβαιώθηκε και στην προηγούμενη ενότητα. Το αφέψημα Σιδερίτη (Τσάι βουνού) περιείχε σημαντική ποσότητα χλωρογενικού οξέος, αν και η μεγαλύτερη συγκέντρωση που προσδιορίστηκε με τη συγκεκριμένη μέθοδο καταγράφηκε στο αφέψημα από Χαμομήλι. Στο αφέψημα Φασκόμηλου ανιχνεύτηκαν 27 από τις 31 ενώσεις, ανάμεσά τους τα τριτερπενικά οξέα, ολεανολικό και ουρσολικό, για τα οποία στο συγκεκριμένο αφέψημα βρέθηκαν οι υψηλότερες προσδιορισθείσες συγκεντρώσεις. Τέλος, το αφέψημα από Φλισκούνι αν και ήταν το τρίτο κατά αύξουσα σειρά βότανο σε φαινολικά συστατικά, ξεχώρισε λόγω υψηλής συγκέντρωσης *p*-κουμαρικού οξέος που περιείχε (107.9±5.5 μg/κούπα).

Πίνακας 3.2Α Απλές πολυφαινόλες και τερπενικά οξέα (μg/κούπα) στα αφεψήματα των βοτάνων (μ. όροι τριών αναλύσεων±sd)

Φαινολικό Συστατικό	**A1**	**A2**	**A3**	**A4**	**A5**	**A6**
p-υδροξυ- βενζοϊκό οξύ	53.4 ± 4.6	10.6 ± 1.5	11.2 ± 1.5	21.0 ± 2.0	11.7 ± 1.3	21.4 ± 1.9
βανιλικό οξύ	37.4 ± 2.5	14.8 ± 1.2	11.2 ± 1.6	30.1 ± 0.8	55.7 ± 3.7	49.4 ± 1.5
πρωτοκατεχικό οξύ	54.6 ± 6.4	2.4 ± 0.4	38.9 ± 3.6	42.9 ± 2.4	31.7 ± 2.4	58.5 ± 1.9
συριγγικό οξύ	99.5 ± 12.5	5.5 ± 0.4	24.6 ± 2.9	45.6 ± 2.0	83.0 ± 6.5	88.4 ± 4.5
γαλλικό οξύ	6.8 ± 3.4		15.0 ± 2.5			25.1 ± 2.8
p-υδροξυφαινυλοξικό οξύ	8.3 ± 4.2					16.5 ± 1.3
3-4 διυδροξυφαινυλοξικό οξύ			73.4 ± 17.3	69.2 ± 3.4	25.6 ± 0.4	85.7 ± 3.4
βανιλίνη					5.8 ± 0.2	
τυροσόλη	0.2 ± 0.0					
κινναμωμικό οξύ	6.2 ± 0.3	4.3 ± 0.2	5.8 ± 0.5	7.3 ± 1.0	8.9 ± 1.4	10.5 ± 2.6
φλωρετικό οξύ						
o-κουμαρικό οξύ	10.9 ± 5.4		10.1 ± 0.8		33.9 ± 3.9	33.8 ± 2.8
p- κουμαρικό οξύ	15.2 ± 7.6	13.6 ± 0.7	18.6 ± 2.9			79.1 ± 5.4
φερουλικό οξύ	29.9 ± 0.9	9.6 ± 1.1			37.2 ± 3.7	80.3 ± 2.5
καφεϊκό οξύ	113.5 ± 9.5	61.3 ± 2.6	67.8 ± 6.8	340.8 ± 35.4	310.4 ± 12.5	630.1 ± 28.5
σιναπικό οξύ	22.5 ± 0.1	5.8 ± 0.9			26.0 ± 1.6	55.8 ± 4.3
ροσμαρινικό οξύ		669.2 ± 78.5	7244.0 ± 333.0	6838.5 ± 273.5	7007.3 ± 103.0	9674.4 ± 254.0
χλωρογενικό οξυ	23.5 ± 1.9		37.0 ± 4.3		27.4 ± 3.9	
χρυσίνη	21.3 ± 1.4		28.9 ± 0.8			68.6 ± 2.2
επικατεχίνη	19.2 ± 1.3	4.8 ± 0.3	36.2 ± 1.9	20.0 ± 1.4	21.2 ± 1.5	39.5 ± 5.3
ναριγκενίνη	109.3 ± 11.9		22.0 ± 1.0	65.6 ± 9.5	33.6 ± 3.2	58.3 ± 4.4
κατεχίνη	29.9 ± 0.6	8.1 ± 1.2	32.4 ± 6.4	34.7 ± 0.7	38.2 ± 1.8	61.5 ± 7.5
γενιστεΐνη			31.4 ± 1.8	39.0 ± 8.3	29.8 ± 1.6	
καμπφερόλη	19.4 ± 0.1					44.7 ± 6.0
κερκετίνη	22.2 ± 1.2		15.7 ± 2.9			43.7 ± 5.3
θυμόλη	6046.0 ± 121.0			34381.8 ± 683.0	80655.6 ± 3184.9	1011.6 ± 74.1
καρβακρόλη	26274.0 ± 325.0	362.3 ± 38.9	36416.9 ± 2317.0	87813.9 ± 795.0	182138.0 ± 5651.7	2976.5 ± 125.6
ολεανολικό οξύ	14.5 ± 0.3	17.7 ± 1.3				32.7 ± 2.8
ουρσολικό οξύ	53.4 2.0	12.2 ± 0.7		21.0 ± 3.5		48.2 ± 0.7
			Σύνολο			
Σύνολο αποτελεσμάτων	*33038.1 ± 521.9*	*1199.9 ± 129.9*	*44140.9 ± 2709.1*	*129771.0 ± 1544.7*	*270581.1 ± 8989.0*	*15294.2 ± 549.4*
Φαινολικά οξέα	*428.1 ± 54.6*	*784.2 ± 86.0*	*7546.3 ± 376.2*	*7374.3 ± 45.0*	*7647.1 ± 143.0*	*10887.7 ± 315.5*
Υδροξυ-κινναμωμικά οξέα	*221.6 ± 25.6*	*761.5 ± 84.0*	*7383.2 ± 348.3*	*7186.6 ± 36.4*	*7451.1 ± 130.0*	*10564.1 ± 300.1*
Φλαβονοειδή	*221.3 ± 16.4*	*12.9 ± 1.5*	*166.6 ± 14.8*	*159.2 ± 19.8*	*122.8 ± 8.1*	*316.2 ± 30.7*
Τερπενοειδείς φαινόλες	*32320.0 ± 446.0*	*362.3 ± 38.9*	*36416.9 ± 2317.0*	*122195.7 ± 1478.0*	*262793.6 ± 8836.6*	*3988.1 ± 199.7*
Τερπενικά οξέα	*14.5 ± 0.3*	*29.9 ± 2.1*		*21.0 ± 1.9*		*80.8 ± 3.5*

*Όπου A1: Αντωναΐδα, A2: Δενδρολίβανο, A3: Δίκταμο, A4: Θρύμπα, A5: Θυμάρι, A6: Μαντζουράνα *κούπα: 200 mL

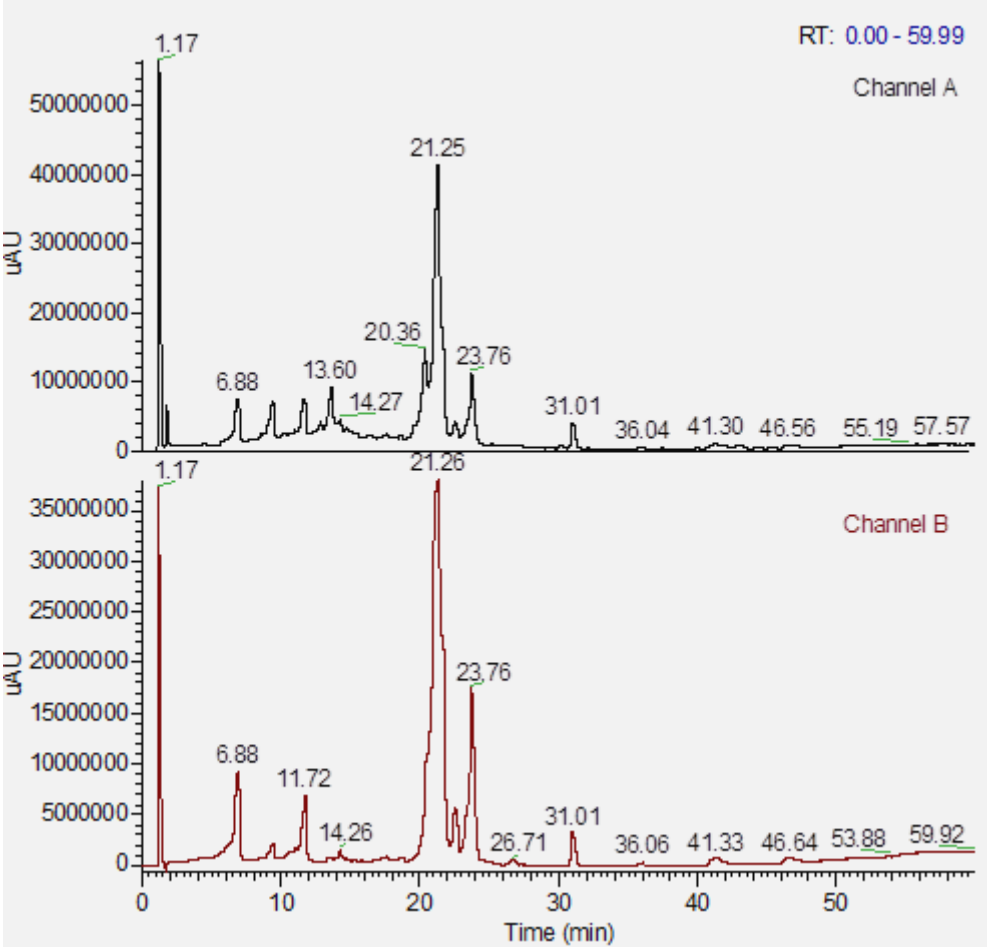
Πίνακας 3.2Β Απλές πολυφαινόλες και τερπενικά οξέα (μg/κούπα) στα αφεψήματα των βοτάνων (μ. όροι τριών αναλύσεων±sd) (Συνέχεια)

Φαινολικό Συστατικό	**A7**	**A8**	**A9**	**A10**	**A11**	**A12**	**A13**
p-υδροξυ- βενζοϊκό οξύ	5.9 ± 0.5	56.7 ± 8.4	42.8 ± 5.1	33.9 ± 1.2	18.7 ± 1.4	17.7 ± 7.7	18.3 ± 1.2
βανιλικό οξύ	1.3 ± 0.3	32.3 ± 2.5	59.0 ± 2.4	24.9 ± 0.4	10.6 ± 1.8	45.0 ± 14.1	100.6 ± 10.3
πρωτοκατεχικό οξύ	12.7 ± 0.8	169.3 ± 35.7	274.0 ± 16.5	54.7 ± 6.1	22.0 ± 2.9	23.3 ± 4.5	588.3 ± 125.9
συριγγικό οξύ	4.0 ± 0.3	39.1 ± 1.2	35.6 ± 3.4	37.4 ± 1.5	13.0 ± 1.8	35.3 ± 9.1	32.2 ± 2.8
γαλλικό οξύ	0.2 ± 0.0		100.6 ± 7.1	0.3 ± 0.0			32.0 ± 13.1
p-υδροξυφαινυλοξικό οξύ	2.1 ± 0.2						
3-4 διυδροξυφαινυλοξικό	253.4 ± 40.2	43.8 ± 5.2			7.0 ± 0.9	18.3 ± 0.9	
βανιλίνη	1.6 ± 0.3						
τυροσόλη	0.5 ± 0.1				7.8 ± 0.8		
κινναμωμικό οξύ	8.3 ± 12.8		11.8 ± 0.6	16.7 ± 1.0	3.2 ± 0.3	14.4 ± 4.9	33.8 ± 3.1
φλωρετικό οξύ	4.1 ± 0.2				2.7 ± 0.4		
o-κουμαρικό οξύ		19.8 ± 9.9		22.5 ± 0.4	10.2 ± 1.9	29.3 ± 8.4	
p- κουμαρικό οξύ	22.7 ± 3.9	46.2 ± 1.9	77.0 ± 7.1	56.7 ± 6.6	16.5 ± 2.3	107.9 ± 5.5	44.1 ± 3.5
φερουλικό οξύ	7.2 ± 0.8	46.1 ± 2.3	47.8 ± 3.6	28.8 ± 0.5	17.1 ± 1.7		48.6 ± 0.6
καφεϊκό οξύ	543.6 ± 33.0	895.2 ± 46.4	183.9 ± 21.1	73.6 ± 14.5	262.8 ± 70.5	375.4 ± 185.2	263.0 ± 60.4
σιναπικό οξύ	0.7 ± 0.1				12.9 ± 0.3	24.6 ± 0.2	
ροσμαρινικό οξύ	43558.2 ± 1735.6	23848.0 ± 1430.9		481.0 ± 38.5	8082.6 ± 100.4	4413.0 ± 397.1	860.0 ± 70.5
χλωρογενικό οξυ	1.2 ± 0.9		10.5 ± 3.3	826.5 ± 87.2	16.4 ± 2.3	105.4 ± 26.1	4800.3 ± 295.2
χρυσίνη			63.1 ± 8.5	43.4 ± 12.3	13.0 ± 1.9	46.6 ± 5.2	55.8 ± 3.9
επικατεχίνη		45.5 ± 6.6	29275.4 ± 1240.9	38.4 ± 7.6	9.4 ± 0.3	22.9 ± 3.2	27.5 ± 0.3
ναριγκενίνη	1.0 ± 0.0	118.0 ± 40.2		20.7 ± 0.1	18.7 ± 5.1		
κατεχίνη		61.3 ± 3.8	3448.2 ± 394.5	30.6 ± 1.8	15.9 ± 1.1	32.3 ± 0.9	49.5 ± 0.9
γενιστεΐνη		76.5 ± 44.3			21.3 ± 4.2		447.9 ± 50.2
καμπφερόλη	0.2 ± 0.0		165.4 ± 17.9		11.5 ± 1.4		33.4 ± 1.1
κερκετίνη		39.1 ± 3.4	3134.4 ± 298.1	96.6 ± 16.4	10.9 ± 0.8		31.4 ± 0.2
θυμόλη	4189.6 ± 82.9	2545.0 ± 174.0			1859.0 ± 83.2	1727.0 ± 57.0	
καρβακρόλη	668.5 ± 25.4	177855.0 ± 803.0	2245.7 ± 202.7	1220.0 ± 127.0	3745.3 ± 290.4	3755.0 ± 82.0	9321.5 ± 313.2
ολεανολικό οξύ	57.4 ± 7.6	29.8 ± 2.2			66.2 ± 5.7	13.3 ± 2.5	
ουρσολικό οξύ	14.6 ± 5.2	40.1 ± 3.1			40.6 ± 6.2	22.0 ± 2.8	
			Σύνολο				
Σύνολο αποτελεσμάτων	*49358.9 ± 1950.7*	*206006.0 ± 1194.2*	*39175.1 ± 2227.7*	*3106.6 ± 283.8*	*14315.2 ± 586.9*	*10828.7 ± 415.1*	*16790.0 ± 885.2*
Φαινολικά οξέα	*87979.0 ± 3565.4*	*25139.5 ± 105.0*	*800.1 ± 65.1*	*1622.9 ± 118.0*	*8476.8 ± 186.9*	*5191.5 ± 258.9*	*6802.9 ± 514.9*
Υδροξυ-κινναμωμικά οξέα	*44145.0 ± 1787.1*	*24854.9 ± 60.5*	*330.9 ± 35.7*	*1505.9 ± 110.1*	*8424.2 ± 179.5*	*5069.6 ± 230.4*	*6049.8 ± 362.4*
Φλαβονοειδή	*1.2 ± 0.0*	*340.3 ± 98.3*	*36086.5 ± 1959.9*	*229.6 ± 38.0*	*100.8 ± 14.7*	*101.8 ± 5.0*	*645.4 ± 56.6*
Τερπενοειδείς φαινόλες	*4858.1 ± 108.3*	*180400.0 ± 977.2*	*2245.6 ± 202.7*	*1220.2 ± 126.5*	*5604.3 ± 373.6*	*5482.6 ± 138.6*	*9321.5 ± 313.2*
Τερπενικά οξέα	*72.0 ± 12.7*	*69.9 ± 5.3*			*106.7 ± 11.7*	*35.3 ± 5.3*	

*Όπου A7: Μελισσόχορτο, A8: Ρίγανη, A9: Σπαθόχορτο, A10: Τσάι βουνού, A11: Φασκόμηλο, A12: Φλισκούνι, A13: Χαμομήλι, *κούπα: 200 mL

3.1.3 Ταυτοποίηση Φαινολικών Συστατικών στα Αφεψήματα

Για τη διαλεύκανση των δομών με τις οποίες τα φαινολικά συστατικά απαντούν στα αφεψήματα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με ανιχνευτές: υπεριώδους συστοιχίας διόδων (DAD) και φασματογράφο μάζας (MS). Από την αξιολόγηση των χρωματογραφημάτων, των φασμάτων απορρόφησης και των θραυσμάτων μάζας, ταυτοποιήθηκαν στο σύνολο των αφεψημάτων 64 φαινολικά συστατικά, ενώ 17 συστατικά δεν έγινε δυνατόν να ταυτοποιηθούν. Στην Εικόνα 3.2 παρουσιάζεται ενδεικτικό χρωματογράφημα των φαινολικών δομών αφεψήματος Σπαθόχορτου, του ποιοτικά πλουσιότερου σε συστατικά βοτάνου της μελέτης όπως χαρακτηρίστηκε με τη μέθοδο LC-DAD-MS, σε διαφορετικά μήκη κύματος (Channel A: 280 nm, μήκος κύματος για πολυφαινόλες, Channel B: 400 nm, μήκος κύματος για τα φλαβονοειδή).



Εικόνα 3.2 Χρωματογράφημα LC-DAD φαινολικών συστατικών του αφεψήματος Σπαθόχορτου (A9)

Αναλυτικά, στο αφέψημα Αντωναΐδας (συνολικά προσδιορίστηκαν 6 δομές) ανιχνεύτηκαν κυρίως παράγωγα απλών φαινολικών οξέων και γλυκοζυλιωμένα παράγωγα φλαβονοειδών. Το αφέψημα Δενδρολίβανου χαρακτηρίστηκε από την παρουσία

γλυκοζυλιωμένων και μεθυλιωμένων παραγώγων φλαβονών, ενώ επιβεβαιώθηκε και η παρουσία του ροσμαρινικού οξέος. Στο αφέψημα Δίκταμου προσδιορίστηκαν 10 συνολικά δομές, εκ των οποίων οι τρεις αφορούν παράγωγα πολυκυκλικών φαινολικών καρβοξυλικών οξέων. Το ίδιο αφέψημα περιείχε επίσης ροσμαρινικό και χλωρογενικό οξύ και παράγωγα αυτών. Στο αφέψημα Θρύμπας ανιχνεύτηκαν κυρίως απλά φαινολικά οξέα και γλυκοζυλιωμένα παράγωγα της λουτεολίνης και της ναριγκενίνης. Παρόμοιες δομές φαινολικών οξέων προσδιορίστηκαν και στο αφέψημα Θυμαριού μαζί με την παρουσία ενός γλυκοζίτη φλαβόνης. Το αφέψημα Μαντζουράνας ξεχώρισε λόγω της παρουσίας της εσπεριδίνης, η οποία ανήκει στις φλαβονόνες, ενώ οι υπόλοιπες ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν ήταν παρόμοιες με αυτά των υπόλοιπων βοτάνων του ίδιου γένους. Στο αφέψημα Μελισσόχορτου, μεταξύ των αναγνωρισθέντων συστατικών περιλαμβάνονται υδροξυ-κινναμωμικά οξέα, όπως το ροσμαρινικό οξύ και παράγωγα τους. Επιπλέον, αναγνωρίστηκε ένα διμερές της κατεχίνης και ένα γλυκουρονικό παράγωγο της λουτεολίνης. Το αφέψημα Ρίγανης χαρακτηρίστηκε κυρίως από την παρουσία γλυκοζυλιωμένων παραγώγων φλαβονών, και ειδικότερα απιγενίνης. Ποιοτικά παρόμοιες δομές εντοπίστηκαν και στο αφέψημα Σπαθόχορτου (13 στο σύνολο), στο οποίο ανιχνεύθηκε επίσης μια διμεθοξυφλαβόνη και η διτερπενική αλκοόλη, ροσμανόλη. Το πλούσιο σε φαινολικά συστατικά αφέψημα Σπαθόχορτου χαρακτηρίστηκε επίσης από την παρουσία γλυκοζυλιωμένων παραγώγων της κερκετίνης. Τα αφεψήματα Σιδερίτη (Τσάι βουνού) και Φασκόμηλου περιείχαν παράγωγα της απιγενίνης και της λουτεολίνης, αντίστοιχα, ενώ στο τελευταίο ταυτοποιήθηκαν επίσης ροσμαρινικό οξύ και παράγωγα αυτού. Στο αφέψημα από Φλισκούνι μεταξύ άλλων ταυτοποιήθηκαν ροσμαρινικό οξύ και παράγωγα λουτεολίνης και απιγενίνης. Τέλος, στο αφέψημα του Χαμομηλιού ανιχνεύθηκαν κυρίως παράγωγα υδροξυ-κινναμωμικών οξέων όπως του φερουλικού οξέος και γλυκοζυλιωμένοι εστέρες φλαβονοειδών.

Πίνακας 3.3Α Πολυφαινολικές δομές στα αφεψήματα των βοτάνων

Α/Α	RT (min)	λ_{max} (nm)	Μοριακό ιόν $(M+H)^+$ (m/z)	Θραύσματα	Προτεινόμενη δομή	Α1	Α2	Α3	Α4	Α5	Α6
1	6.88	244, 320, 290sh	-	377 (354+Na^+), 163	μη ταυτοποιηθέν παράγωγο του χλωρογενικού οξέος	○	○	●	○	○	○
2	11.49	282	-	513= M+H_2O + CH_3OH + H^+, 367	παράγωγο τευκροζίτη (ραμνοζίτης του καφεϊκού εστέρα της τυροσόλης)	●	○	○	○	○	○
3	16.76	236, 272, 336	595	617 (M+Na^+), 449, 287	4'-O- ρουτινοζίτης της λουτεολίνης	○	○	○	●	○	○
4	16.77	272, 334	595	287, 617 (M+Na^+)	ρουτινοζίτης της λουτεολίνης πιθανώς υποκατεστημένος στον C-4'	●	○	○	○	○	○
5	16.8	272, 338	595	617 (M+Na^+), 337, 325, 295, 273	νισενίνη-2 (6,8-δι-c-γλυκοπυρανοαπιγενίνη	○	○	●	○	○	○
6	16.91	270, 340	595	433, 271	διγλυκοζυλιωμένος εστέρας της απιγενίνης	○	○	○	○	○	●
7	19.13	250, 286, 320	457	457	μη ταυτοποιηθέν	○	○	○	○	○	●
8	22.04	320, 290sh	-	163	παράγωγο του καφεϊκού οξέος	●	○	○	○	○	○
9	22.25	266, 328	-	307, 409	μη ταυτοποιηθέν	○	●	○	○	○	○
10	22.50	244, 290sh, 328	361	383 (M+Na^+), 163	ροσμαρινικό οξύ	○	●	●	●	●	●
11	22.80	242, 290sh, 330	355	163	χλωρογενικό οξύ	○	○	●	●	●	○
12	23.52	266, 340	747	345, 385, 517	6-υδροξυ-τριμεθυλιωμένη λουτεολίνη	●	○	○	○	○	○
13	24.02	244, 290sh, 318	539	561 (M+Na^+), 433, 341, 297	λιθοσπερμικό οξύ	○	○	●	○	○	○
14	24.45	240, 332	-	247, 307	μη ταυτοποιηθέν	○	●	○	○	○	○
15	24.59	252, 264, 348	609	631 (M+Na^+), 463, 301	3'-O-ρουτινοζίτης 7-μεθυλιωμένης φλαβόνης	○	○	○	○	●	○
16	24.63	256, 266, 348	609	631 (M+Na^+), 449, 301	3'-O-γλυκοζυλιωμένος ραμνοζίτης της 7-O-μεθυλ-λουτεολίνης	○	○	○	●	○	○
17	25.59	268, 344	463	301	3'-O-γλυκοζίτης της 7-O-μεθυλ-λουτεολίνης	○	●	○	○	○	○
18	25.71	246, 290sh, 334	539	561 (M+Na^+), 433, 341, 297	ισομερές του λιθοσπερμικού οξέος	○	○	●	○	○	○
19	26.76	244, 308, 318	539	561 (M+Na^+), 373, 341	ισομερές του λιθοσπερμικού οξέος	○	○	●	○	○	○
20	26.8	240, 290	565	587 (M+Na^+), 419, 273	κουμαροϋλραμνοζίτης της ναρινγκενίνης	○	○	○	●	○	○
21	28.72	268, 334	593	615 (M+Na^+), 491, 285	4'-O- ρουτινοζίτης της 7-O-μεθυλιωμένης απιγενίνης	○	○	○	○	●	○
22	29.07	242, 286, 318	-	741 (M+Na^+), 553, 521	παράγωγο του λιθοσπερμικού οξέος και του 3-(3,4-διυδροξυφαινυλπροπανικού οξέος	○	○	●	○	○	○
23	30.17	238, 288	303	177	εσπεριτίνη	○	○	○	○	○	●
24	30.67	256, 334	-		μη ταυτοποιηθέν	○	○	●	○	○	○

A/A	RT (min)	λ_{max} (nm)	Μοριακό ιόν $(M+H)^+$ (m/z)	Θραύσματα	Προτεινόμενη δομή	A1	A2	A3	A4	A5	A6
25	30.71	270, 346	353		διμεθυλιωμένη 5,6,7,3',4'-πενταϋδροξυφλαβόνη	●	●	○	○	○	○
26	32.58	240, 280, 414	345	711 ($M\times2+Na^+$), 689 ($M\times2+H^+$), 399 ($M+CH_3OH+Na^+$), 377 ($M+CH_3OH+H^+$), 367 ($M+Na^+$), 362 ($M+H_2O$)	πενταϋδροξυ 3-Ο-μεθυλιωμένη αουρόνη	○	●	○	○	○	○
27	33.12	242, 274, 332,	375	771 ($M\times2+Na^+$), 457 ($M+CH_3COOH+Na^+$), 429 ($M+Na^++CH_3OH$)	($M+H_2O$) Εξαϋδροξυ-τετρα-Ο-μεθυλιωμένη φλαβόνη	○	●	○	○	○	○
28	34.27	274	-	323 ($M+Na^+$), 181	γλυκοζίτης του *p*-υδροξυβενζοϊκού	○	○	●	○	●	○
29	34.33	274	-	279	παράγωγο νεοκληροδάνιου	●	●	○	○	○	○
30	34.36	274	-	323 ($M+Na^+$), 181	γλυκοζίτης του *p*-υδροξυβενζοϊκού	○	○	○	●	○	○
31	35.17	240, 280, 336	345	711 ($M'2+Na^+$), 367 ($M+Na^+$)	OH-4' μεθυλιωμένη φλαβόνη	○	○	●	○	○	○
32	35.66	240, 266, 316	353	375 ($M+Na^+$)	μη ταυτοποιηθέν	○	○	○	○	○	○
33	36.9	266, 344	285	269 (radical positive; methyl loss)	7-Ο-μεθυλ-απιγενίνη	○	●	○	○	○	○
34	37.50	240, 274, 350, 414	465	487 ($M+Na^+$), 433	μεθυλ-ανθρανόλη	○	○	○	○	●	○

*Όπου A1: Αντωναΐδα, A2: Δενδρολίβανο, A3: Δίκταμο, A4: Θρύμπα, A5: Θυμάρι, A6: Μαντζουράνα, *●: δηλώνει παρουσία της ουσίας και ○: δηλώνει απουσία της ουσίας

Πίνακας 3.3Β Πολυφαινολικές δομές στα αφεψήματα των βοτάνων (Συνέχεια)

A/A	RT (min)	λ_{max} (nm)	Μοριακό ιόν $(M+H)^+$ (m/z)	Θραύσματα	Προτεινόμενη δομή	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13
1	9.4	310	-	361 ($M+Na^+$), 147	κινικός εστέρας του *p*-κουμαρικού	○	○	●	○	○	○	○
2	10.1	284	-	353, 331, 187,153	μη ταυτοποιηθήσα φλαβόνη ή ισοφλαβόνη	○	●	○	○	○	○	○
3	10.12	264	453		μη ταυτοποιηθέν	○	○	○	○	●	○	○
4	11.38	244, 318			παράγωγο του φερουλικού οξέος	●	○	○	○	○	○	○
5	11.59	244, 328	645	515, 451, 163	καφεϊκός εστέρας του σικιμικού οξέος, γλυκοζυλιωμένος ραμνοζίτης	○	○	○	○	○	○	●
6	11.66	246, 320, 328sh	579	317, 163	ηλεκτρικός (σουκινικός) γλυκοζίτης της τευκρόλης	○	○	●	○	○	○	○
7	13.6	240, 278	603	373, 291	μη ταυτοποιηθέν	○	○	●	○	○	○	○
8	13.94	242, 302	357	379 ($356+Na^+$), 195 (ferulic acid+1)	γλυκοζίτης του φερουλικού οξέος	○	○	○	○	○	○	●
9	16.76	236, 272, 336	595	617 ($M+Na^+$), 449, 287	4'-Ο- ρουτινοζίτης της λουτεολίνης	○	○	○	○	●	○	○
10	17.18	256, 286, 344	561	271	πιθανώς παράγωγο γλυκοζίτη της απιγενίνης, εστεροποιημένο με κετογλουταρικό οξύ	○	○	○	○	○	●	○
11	17.35	274	579		διμερές κατεχίνης (προκυανιδίνη)	●	○	○	○	○	○	○

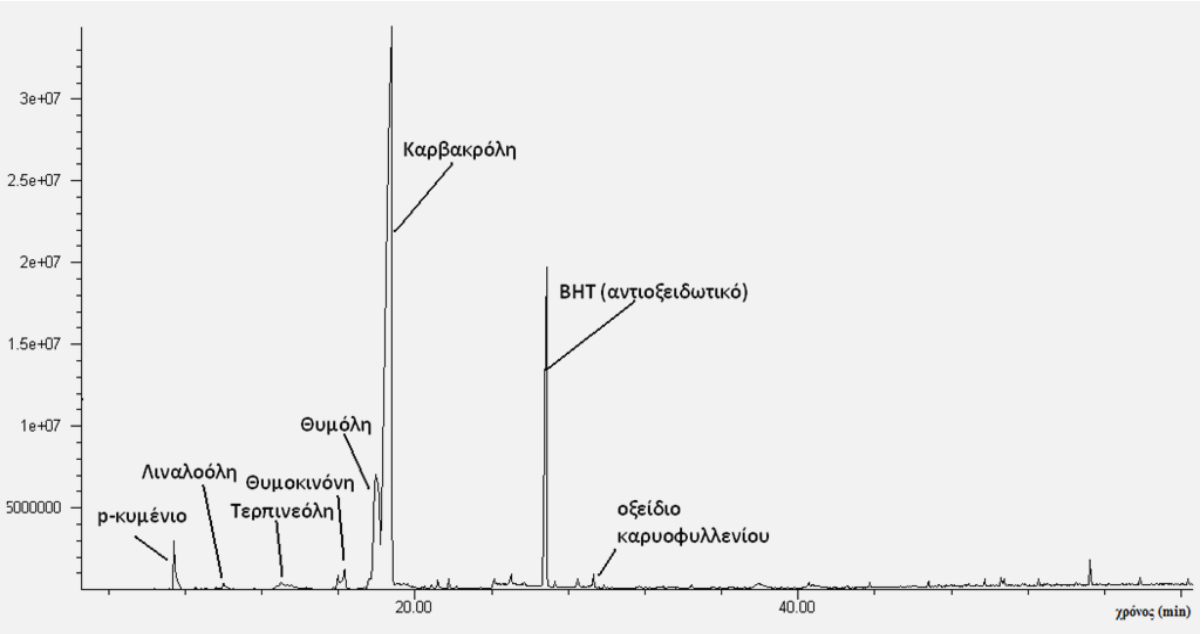
A/A	RT (min)	λ_{max} (nm)	Μοριακό ιόν $(M+H)^+$ (m/z)	Θραύσματα	Προτεινόμενη δομή	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13
12	18.62	242, 294, 316	357	379 ($356+Na^+$), 195 (ferulic acid+1)	γλυκοζίτης του φερουλικού οξέος	○	○	○	○	○	○	●
13	18.75	246, 320, 328			παράγωγο του φερουλικού οξέος	●	○	○	○	○	○	○
14	20.18	332, 290sh*	779	131, 163, 263, 325, 647	παράγωγο του καφεϊκού οξέος που περιέχει μια μονάδα κινικού οξέος, μια εξόζη και μια πεντόζη εστεροποιημένη με 2-υδροξυ-3-οξο-ηλεκτρικό οξύ	○	○	○	●	○	○	○
15	20.36	240, 292	451	473 ($M+Na^+$), 305, 179	3-O-ραμνοζίτης της 3, 4, 2’, 6’ τετραϋδροξυ, 4’μεθοξυ διυδροχαλκόνης	○	○	●	○	○	○	○
16	20.53	330, 290sh		163, 325, 515, 647	παράγωγο του καφεϊκού οξέος όμοιο με την ένωση No 14	○	○	○	●	○	○	○
17	20.77	256, 344	463	287	γλυκουρονίδιο της λουτεολίνης	○	●	○	○	○	○	○
18	20.79	240, 348	463	287	3´-O-γλυκουρονικός εστέρας της λουτεολίνης	○	○	○	○	●	○	○
19	21.24	264, 352	449	471 ($M+Na^+$), 287	7-O- γλυκοζίτης της λουτεολίνης	○	○	○	○	○	○	●
20	21.26	256, 354	465	487 ($M+Na^+$), 303	συνεκλουόμενες ενώσεις: 3-O-γαλακτοζίτης της κερκετίνης (υπεροσίδη) και 3-O-γλυκοζίτης της κερκετίνης (ισοκερκιτρίνη)	○	○	●	○	○	○	○
21	21.57	246, 316sh, 328			ροσμαρινικό οξύ, συνεκλουόμενο με παράγωγο χλωρογενικού οξέος	●	○	○	○	○	○	○
22	22.18	248, 288sh, 330	361	743 ($M\times2+Na^+$), 383 ($M+Na^+$), 163	ισομερές του ροσμαρινικού οξέος	○	○	○	○	●	○	○
23	22.2	328, 292sh	-	163, 647	παράγωγο του καφεϊκού οξέος όμοιο με την ένωση No 14	○	○	○	●	○	○	○
24	22.55	254, 354	435	457 ($M+Na^+$), 303	πεντοζίτης της 3 ή 4'- O-κερκετίνης	○	○	●	○	○	○	○
25	22.50	244, 290sh, 328	361	383 ($M+Na^+$), 163	ροσμαρινικό οξύ	●	○	○	○	●	●	○
26	22.80	242, 290sh, 330	355	163	χλωρογενικό οξύ	○	●	○	○	○	○	○
27	23.1	266, 340	447	429 (dehydration of M+1), 271	γλυκουρονίδιο της απιγενίνης	○	●	○	○	○	○	○
28	23.35	266, 332	433	455 ($M+Na^+$), 271	7-O- γλυκοζίτης της απιγενίνης	○	○	○	○	○	○	●
29	23.48	266, 340	433	515= (M+1+CH3OH+CH3OH+H2O)271	7-O-ξυλοζίτης της απιγενίνης	○	○	○	●	○	○	○
30	23.76	254, 350	449	472 ($M+Na^+$), 303	κερκιτρίνη	○	○	●	○	○	○	○
31	24.37	252, 344	433	271	γλυκοζίτης της απιγενίνης	○	●	○	○	○	○	○
32	24.44	254, 270, 334	463	485 ($M+Na^+$), 301, 286	ομοπλανταγενίνη	○	○	○	○	●	○	○
33	24.58	252, 266, 346	609	631, 433, 301	3'-O-ρουτινοζίτης της 7-O-μεθυλ-λουτεολίνης	○	○	○	○	○	●	○
34	25.56	244, 268, 340			7’-OH ή 4’-OH γλυκουρονικό παράγωγο λουτεολίνης	●	○	○	○	○	○	○

A/A	RT (min)	λ_{max} (nm)	Μοριακό ιόν $(M+H)^+$ (m/z)	Θραύσματα	Προτεινόμενη δομή	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13
35	27.1	260, 316	521	575 ($M+Na^+$+CH_3OH) , 355	χλωρογενικό οξύ εστεροποιημένο με 2-υδροξυφαινυλοξικό οξύ	○	○	○	○	○	●	○
36	27.62	242, 288, 320, 328			μη ταυτοποιηθέν	●	○	○	○	○	○	○
37	28.29	240, 346	577	599 ($M+Na^+$), 515, 317, 301	3'-O-γλυκοζυλομηλεϊνικός εστέρας της 6-υδροξυ, 7-O-μεθυλ-λουτεολίνης	○	○	●	○	○	○	○
38	30.28	240, 340, 322sh	715	451, 429, 401, 379	C,O-διγλυκοζίτης, πιθανά: 4'-O-γλυκοζυλο, 6-C-γλυκοζυλβενζοϋλο-απιγενίνη	○	○	●	○	○	○	○
39	30.62	256, 344	-	271, 470	μη ταυτοποιηθέν παράγωγο της απιγενίνης	○	●	○	○	○	○	○
40	30.72	240, 340	711	427, 399, 185	6, 8-δι-C-γλυκοζίτης του ηλεκτρικού εστέρα της λουεολίνης	○	○	●	○	○	○	○
41	31.01	268, 334	539	467, 327	μη ταυτοποιηθέν	○	○	○	○	●	○	○
42	31.37	238, 270, 318	579	601=$M+Na^+$, 471, 271	γλυκοζυλοκουμαρικός εστέρας της απιγενίνης	○	○	○	●	○	○	○
43	31.96	238, 268, 316	661	683=($M+Na^+$), 469, 271	κουμαρικός εστέρας του ραμνοζίτη της απιγενίνης, εστεροποιημένης επίσης με μηλεινικό οξύ	○	○	○	●	○	○	○
44	32.73	338	315	337 ($M+Na^+$), 247	κιρσιμαριτίνη (cirsimaritin) φλαβονοειδές	○	○	●	○	○	○	○
45	34.29	274	-	323 ($M+Na^+$), 181	*p*-υδροξυ βενζοϋκή γλυκόζη	○	●	○	○	○	○	○
46	35.66	240, 266, 316	353	375 ($M+Na^+$)	μη ταυτοποιηθέν	○	○	○	○	○	○	●
47	35.8	242, 288, 318			μη ταυτοποιηθέν	●	○	○	○	○	○	○
48	37.93	242, 316	-	415 (383+ CH3OH), 383 ($M-H_2O+CH_3OH+Na^+$), 329,	ροσμανόλη	○	○	●	○	○	○	○
49	42.00	278, 334	301	$M+CH_3OH+H^+$	6-μεθοξυ-απιγενίνη	○	○	●	○	○	○	○
50	46.5	330, 544	505		υπερικίνη	○	○	○	○	●	○	○

*Όπου A7: Μελισσόχορτο, A8: Ρίγανη, A9: Σπαθόχορτο, A10: Τσάι βουνού, A11: Φασκόμηλο, A12: Φλισκούνι, A13: Χαμομήλι, *●: δηλώνει παρουσία της ουσίας και ○: δηλώνει απουσία της ουσίας

3.1.4 Προσδιορισμός Πτητικών Συστατικών στα Αφεψήματα

Η εκχύλιση των αφεψημάτων με διαιθυλαιθέρα οδήγησε στην παραλαβή λιπόφιλων συστατικών, για την ταυτοποίηση των οποίων χρησιμοποιήθηκε αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματογράφο μάζας (GC-MS). Στα πτητικά συστατικά που στόχευε η εκχύλιση περιλαμβάνονται κυρίως λιπόφιλα προϊόντα μικρού μοριακού βάρους όπως τερπενοειδή, παράγωγα λιπαρών οξέων, υδρογονανθρακικές ενώσεις (διακλαδισμένης ή ευθείας αλύσου), βενζοειδή και φαινυλο-προπανοειδή, διάφορες αζωτούχες και θειούχες ενώσεις και παράγωγα αμινοξέων. Παρόλα αυτά, η χρήση μη πολικού διαλύτη μπορεί να οδηγήσει στην παραλαβή και μη πτητικών μορίων. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των πτητικών συστατικών παρουσιάζονται στους Πίνακες 3.4Α και 3.4Β, ενώ στην Εικόνα 3.3 παρουσιάζεται, ενδεικτικά, το αεροχρωματογράφημα του αιθερικού εκχυλίσματος αφεψήματος Θρύμπας.



Εικόνα 3.3 Αεροχρωματογράφημα GC-MS πτητικών συστατικών του αφεψήματος Θρύμπας (Α4)

Στο σύνολο των αφεψημάτων ανιχνεύτηκαν περίπου 400 ενώσεις. Για λόγους πρακτικότητας, στους πίνακες 3.4Α και 3.4Β παρουσιάζονται μόνο οι ενώσεις τα εμβαδά των οποίων ξεπερνούσαν το 0.10 % του συνολικού εμβαδού. Κυρίαρχο συστατικό στην πλειοψηφία των αφεψημάτων ήταν η καρβακρόλη. Με εξαίρεση το αφέψημα από Φλισκούνι, στο οποίο δεν ανιχνεύθηκε, η καρβακρόλη εντοπίστηκε στα υπόλοιπα 12 βότανα τα οποία κατατάσσονται με φθίνουσα σειρά ως εξής: Ρίγανη > Δίκταμο > Θρύμπα > Θυμάρι> Μελισσόχορτο > Αντωναΐδα > Τσάι βουνού > Σπαθόχορτο > Μαντζουράνα > Δενδρολίβανο > Φασκόμηλο > Χαμομήλι. Στο αφέψημα από Φλισκούνι, κυριότερο συστατικό με ποσοστό περίπου 89 % του εμβαδού των εκλουομένων συστατικών βρέθηκε η μονοτερπενική κετόνη πιπεριτόνη (2-

ισοπρολυλ-μεθυλ-3-κυκλοεξεν-1-όνη). Εξετάζοντας τα αποτελέσματα πιο αναλυτικά, στο αφέψημα Αντωναΐδας, ταυτοποιήθηκε μόνο το 34.25 % του εμβαδού των εκλουομένων συστατικών, με κυριότερα συστατικά ήταν τις τερπενοειδείς φαινόλες καρβακρόλη και θυμόλη, ενώ σε μικρότερα ποσοστά περιέχονταν τερπενικές κετόνες, όπως η 1-βερβενόνη. Το αφέψημα Δενδρολίβανου χαρακτηρίστηκε από την παρουσία ευκαλυπτόλης, τερπινεν-4-όλης, α-τερπινεόλης και 2-υδροξυ-1,8-κινεόλης σε ποσοστά 38 %, 17 %, 14 % και 3%, αντίστοιχα. Στο αφέψημα Δίκταμου, ομοίως με το αφέψημα Αντωναΐδας ανιχνεύτηκαν οι καρβακρόλη και θυμόλη καθώς και τερπενικές κετόνες. Τα προφίλ πτητικών συστατικών των αφεψημάτων Θρύμπας και Θυμαριού ήταν παρόμοια με κυρίαρχα συστατικά την καρβακρόλη και τη θυμόλη, κάτι αναμενόμενο λόγω της συγγένειας των δυο αυτών βοτάνων. Ωστόσο, τα ταυτοποιηθέντα συστατικά για το αφέψημα Θυμαριού αποτελούσαν το 76.34 % του ολικού εμβαδού των συστατικών εν αντιθέσει με το 92.64 % του αφεψήματος Θρύμπας. Το αφέψημα της Μαντζουράνας χαρακτηρίσθηκε από την παρουσία της μονοτερπενικής κετόνης 3-θουγιανόνης (περίπου 23 %) και των μονοτερπενικών αλκοολών τερπινεν-4-όλη και α-τερπινεόλη σε ποσοστά περί το 10 %. Στο αφέψημα Μελισσόχορτου ταυτοποιήθηκαν επίσης μονοτερπενικές αλκοόλες, αλδεΰδες ή κετόνες. Κυρίαρχα συστατικά ήταν η καρβακρόλη, και η τερπενική λακτόνη λολιολίδη. Ουσίες όπως η θυμόλη, η γερανιάλη, η Z-κιτράλη, η κιτράλη Β, η κιτράλη Α, η κιτρονελλάλη, η νεράλη κ.α. πιθανά συμβάλλουν στο ιδιαίτερο άρωμα του αφεψήματος. Στο αφέψημα Ρίγανης, ενός ακόμη βοτάνου του γένους *Origanum*, η καρβακρόλη ήταν το κυρίαρχο συστατικό με ποσοστό 85 %, ομοίως με τα συγγενικά του είδη. Στο αφέψημα Σπαθόχορτου ταυτοποιήθηκε μόνο το 50 % του συνόλου των εκλουομένων ουσιών. Μεταξύ των ενώσεων που αναγνωρίσθηκαν ήταν η καρβακρόλη και η 9,12,15-δεκαοκτατριεν-1-όλη σε ίσα ποσοστά. Επιπρόσθετα, το ίδιο αφέψημα είχε υψηλότερα ποσοστά υδρογονανθράκων και καρβοξυλικών οξέων μεταξύ των αφεψημάτων που εξετάσθηκαν. Τα αφεψήματα Σιδερίτη και Φασκόμηλου περιείχαν μεγάλη ποικιλία τερπενικών δομών, με το αφέψημα Φασκόμηλου να περιέχει κυρίως τερπενικές αλκοόλες. Τέλος στο αφέψημα Χαμομηλιού ταυτοποιήθηκαν πολύπλοκες δομές, όπως το 2-(2,4-εξαδιυνυλιδενο)-1,6-διοξασπιρο[4.4]εννεα-3-ένιο.

Πίνακας 3.4Α Κυριότερα πτητικά συστατικά στα αφεψήματα των βοτάνων εκφρασμένα επί τοις εκατόν (%) του συνολικού εμβαδού των εκλουομένων συστατικών

RT	Ένωση	A1	A2	A3	A4	A5	A6
11.47	4-καρένιο	–	–	–	–	–	1.95
11.88	*p*-κιμένιο	–		0.44	2.55	1.52	–
11.88	ευκαλυπτόλη	–	37.71	–	–	–	–
13.35	α-τερπινένιο	–	–	–	–	–	1.89
13.79	τερπινεόλη	–	–	–	–	–	3.28
15.33	λιναλοόλη	–	0.95	–	0.34	0.15	–
15.45	3-θουγιανόνη	–	–	–	–	–	23.26
18.44	βορνεόλη	–	16.99	–	1.01	0.28	–
18.93	τερπινεν-4-όλη	–	2.70	–	0.36	0.16	12.00
19.65	α-τερπινεόλη	–	14.25	–	–	–	10.07
20.18	1-βερβενόνη	0.42	–	–	–	–	–
20.99	2-υδροξυ-1,8-κινεόλη	–	2.75	–	–	–	–
22.21	θυμοκινόνη	–	–	2.45	2.03	–	–
22.44	cis-οξικός γερανυλεστέρας	–	–		–	–	1.88
23.94	2-ισοπροπυλ-4-μεθοξυ πυριμιδίνη	–	–	0.73	–	–	–
24.11	υδροκινόνη	–	–	–	–	–	4.38
24.25	θυμόλη	0.77	0.98	–	16.04	7.09	–
25.70	καρβακρόλη	19.02	1.55	78.14	66.32	64.14	3.46
26.84	ευγενόλη	0.66	0.74	–	–	–	–
27.48	3-(2-πεντενυλ)-1,2,4-κυκλοπεντανοτριόνη	–	–	0.24	–	–	–
28.76	βανιλίνη	0.71	–	–	–	–	–
31.34	4-αιθυλ-1,2-διμεθοξυ-βενζόλιο	–	0.92	–	0.38	0.25	–
32.80	4-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-βουτανόνη	–	–	–	–	–	1.84
34.04	5,6,7,7 τετραϋδρο-4,4,7-τριμεθυλ- βενζοφουρανόνη	0.72	–	0.33	–	–	–
35.20	3,3,5-τριμεθυλ-2-(1-μεθυλαιθυλιδενο) κυκλοπεντανόνη	–	–	1.78	–	–	–
35.17	2,3,6-τριμεθυλ-4-μεθοξυ-φαινόλη	–	–	–	–	0.16	–
35.68	(-) σπαθουλενόνη	0.63	–	–	–	–	–
35.97	οξείδιο του καρυοφυλλενίου		–	–	–	0.15	–
43.20	εποξείδιο ισογερμακρόνης	0.82	–	–	–	–	–
46.17	4,4,8-τριμεθυλτρικυκλο[6.3.1.0(1,5)]δωδεκανο-2,9-διόλη	–	–	–	0.79	0.69	–
65.08	ναριγκενίνη	–	–	–	0.59		–
67.57	σκαλκαπφλαβόνη-ΙΙ	–	–	0.26	–	–	–
	Σύνολο						
Ταυτοποιηθέντα συστατικά		34.25	90.04	85.13	92.64	76.34	85.86
Μη ταυτοποιηθέντα		66.90	9.96	11.75	7.36	23.66	14.14
Υδρογονάνθρακες και καρβοξυλικά οξέα		4.04	2.25	2.70	0.82	1.32	3.04

*Όπου A1: Αντωναΐδα, A2: Δενδρολίβανο, A3: Δίκταμο, A4: Θρύμπα, A5: Θυμάρι, A6: Μαντζουράνα, * RT: χρόνος κατακράτησης (retention time)

Πίνακας 3.4Β Κυριότερα πτητικά συστατικά στα αφεψήματα των βοτάνων εκφρασμένα επί τοις εκατόν (%) του συνολικού εμβαδού των εκλουομένων συστατικών (Συνέχεια)

RT	Ένωση	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13
8.95	5,5-διμεθυλ-2-φουρανόνη	–	–	1.85	–	–	–	–
12.27	ευκαλυπτόλη	–	–	–	–	16.41	–	–
12.48	Βενζυλική αλκοόλη	1.81	–	–	–	–	–	–
16.02	θουγιόνη	–	–	–	–	2.26	–	–
18.33	βορνεόλη	–	0.40	–	–	4.66	–	–
18.80	πιπεριτόνη (4-μεθυλ-1-(1-μεθυλαιθυλ)-3-κυκλοεξεν-1-ολη)	–	–	–	–	0.50	–	–
20.19	l-βερβερόνη	–	–	2.44	–	–	–	–
21.09	εξω-2-υδροξυκινεόλη	–	–	–	–	0.80	–	–
21.42	2-αιθυλ-3-μεθυλ-μαλεϊμίδη	2.68	–		–	–	–	–
21.50	2-Βορνένιο	–	–	3.14	–	–	–	–
21.68	Z-κιτράλη, νεράλη,κιτράλη Β	4.69	–	–	–	–	–	–
22.04	σπαθουλενόλη	–	0.20	–	–	–	–	–
22.11	2-ισοπρολυλ-μεθυλ-3-κυκλοεξεν-1-όνη	–	1.92	–	–	–	88.87	0.21
23.03	Ε-κιτράλη, γερανιάλη, κιτράλη Α	7.09		–	–	–	–	–
23.71	οξικός βορνυλεστέρας	–	–	–	–	1.14	–	–
24.09	θυμόλη	4.59	–	–	2.69	–	–	–
25.40	καρβακρόλη	31.00	84.57	6.18	11.30	1.32	–	1.16
26.08	1-αιθόξυ-4-αιθυλβενζόλιο	–	–	–	–	–	0.46	–
26.61	4'-μεθοξυ-ακετοφαινόνη	–	–	–	8.34	–	–	–
26.97	ευγενόλη	–	0.10	–	–	–	–	–
27.62	*p*-υδροξυβενζαλδεΰδη	–	–	1.53	5.90	–	0.03	–
28.58	βανιλίνη	2.67	0.10	–	4.14	–	0.24	1.83
30.42	τυροσόλη	–	–	–	1.60	–	–	–
31.07	1-(2-υδροξυφαινυλ)-αιθανόνη	–	–	–	–	0.39	–	–
31.08	4'-υδροξυ-ακετοφαινόνη	–	0.06	–	5.61	–	–	–
32.48	4'-υδροξυ-3-μεθυλακετοφαινόνη	–	–	–	–	–	0.44	–
33.80	5,6,7,7a-τετραϋδρο-4,4,7a-τριμεθυλ-2-βενζοφουρανόνη	–	0.03	2.78	2.55	–	–	0.54
34.04	δι-υδρο-ακτινιδιολίδη	7.09	–	–	–	–	–	–
35.26	1-(3,4-διμεθοξυφαινυλ)-αιθανόνη	–	–	–	–	–	0.28	–
35.63	μεγαστιγματριενόνη	–	–	–	–	–	–	0.16
35.75	οξείδιο καρυοφυλλενίου	3.19	–	–	–	–	–	–
36.65	σπαθουλενόλη	–	–	–	–	–	–	0.44
38.31	ιασμονικός μεθυλεστέρας	–	–	–	–	–	0.19	–
39.20	1,6-διμεθυλ-4-(1-μεθυλαιθυλ)-ναφθαλίνιο	–	–	0.69	–		–	–
39.74	2',4'-διυδροξυ-3'-μεθυλακεοφαινόνη	–	–	–	–	2.27	–	–
41.55	7-ακετυλ-2-υδροξυ-2-μεθυλ-5-ισοπροπυλδικυκλο[4.3.0]αιθανόνη	–	–	2.21	–	–	–	–
42.72	λολιολίδη, 2(4H)-βενζο-φουρανόνη	13.9	–	–	–	–	–	–
42.86	4-υδροξυ-3,5-διμεθοξυ-υδρζίδιο βενζοϊκού οξέος	–	–	–	2.56	–	0.09	–

RT	Ένωση	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13
43.08	2-(1,1-διμεθυλαιθυλ)-4-(1,1,3,3-τετραμεθυλβουτυλ)-φαινόλη	–	0.12	–	–	–	–	–
43.16	οξείδιο της βισαβολόλης	–	–	–	–	–	–	9.92
46.08	δις(2-μεθυλπροπυλ) εστέρας του 1,2-βενζοδικαρβοξυλικού οξέος	–	–	0.81	–	–	–	–
46.29	2-(2,4-εξαδιυνυλιδενο)-1,6-διοξασπιρο[4.4]εννεα-3-ένιο	–	–	–	–	–	0.20	33.30
47.20	2-(2,4-εξαδιυνυλιδενο)-trans-6-διοξασπιρο[4.4]εννεα-3-ένιο	–	–	–	–	–	–	8.13
54.67	9,12,15-δεκαοκτατριεν-1-όλη	–	–	6.23	6.00	–	0.28	2.78
67.12	κιρσιμαρτίνη	–	–	–	–	1.70		
		Σύνολο						
Ταυτοποιηθέντα συστατικά		100.00	88.55	52.03	80.66	64.79	92.31	88.08
Μη ταυτοποιηθέντα		--	1.16	20.70	16.36	28.08	1.54	3.49
Υδρογονάνθρακες και καρβοξυλικά οξέα		11.75	11.45	47.97	19.34	35.21	7.69	11.92

*Οπου A7: Μελισσόχορτο, A8: Ρίγανη, A9: Σπαθόχορτο, A10: Τσάι βουνού, A11: Φασκόμηλο, A12: Φλισκούνι, A13: Χαμομήλι, * RT: χρόνος κατακράτησης (retention time)

3.2 Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής και της Αντιαθηρογόνου Δράσης των Αφεψημάτων

3.2.1 Αντιοξειδωτική δράση

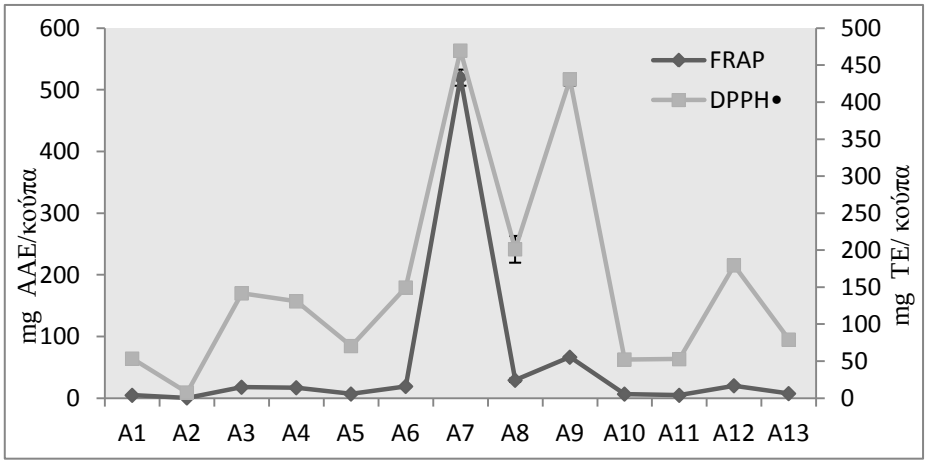
Δεδομένης της παρουσίας πλήθους φαινολικών και τερπενικών συστατικών, γνωστών ως προς την ικανότητά τους να προκαλούν ποικίλες δράσεις, με βασικότερη την αντιοξειδωτική, στη συνέχεια της παρούσας εργασίας εξετάσθηκε η ικανότητα των αφεψημάτων να δρουν ως φυσικά αντιοξειδωτικά *in vitro*. Ο έλεγχος βασίστηκε στη χρήση πρωτοκόλλων που εκτιμούν την ικανότητα των συστατικών ενός δείγματος να δεσμεύουν τη σταθερή ελεύθερη ρίζα $DPPH^{\bullet}$, να ανάγουν τον τρισθενή σίδηρο (Fe^{+++}) σε δισθενή (Fe^{++}), να δημιουργούν χηλικά σύμπλοκα με δισθενή κατιόντα μετάλλων (σιδήρου και χαλκού). Επιπρόσθετα, δεδομένου ότι η οξείδωση της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL) αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα για την ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών (Ενότητα 1.6.4), εκτιμήθηκε η ικανότητα των αφεψημάτων να παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση, αναστέλλοντας την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών του ορού παρουσία $CuSO_4$. Με αυτή τη δοκιμή, τα αφεψήματα των βοτάνων εκτιμήθηκαν για την *in vitro* αντιοξειδωτική/καρδιοπροστατευτική τους ικανότητα.

3.2.1.1 Δοκιμασίες $DPPH^{\bullet}$ και FRAP

Από τα αφεψήματα που εξετάστηκαν τα πιο ικανά στη δέσμευση της ελεύθερης ρίζας $DPPH^{\bullet}$ ήταν του Μελισσόχορτου και του Σπαθόχορτου (469.8±0.79 και 430.8±8.40 mg ισοδυνάμων Trolox (TE)/κούπα, αντίστοιχα) ενώ ακολούθησε αυτό της Ρίγανης. Το αφέψημα για το οποίο καταγράφηκε η χαμηλότερη ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας ήταν το Δενδρολίβανο (7.7±0.85 TE/κούπα). Τα αποτελέσματα των υπολοίπων αφεψημάτων εκφρασμένα σε mg ισοδυνάμων Trolox/ κούπα (mg TE/κούπα) κυμάνθηκαν μεταξύ 52.3-201.3 (Διάγραμμα 3.2). Σημειώνεται, ότι η ικανότητα του Μελισσόχορτου και Σπαθόχορτου να επιδεικνύουν αντιοξειδωτική δράση, εκτιμώμενη με τα μέθοδο αυτή βρέθηκε να είναι διπλάσια του αμέσως επόμενου, δηλαδή της Ρίγανης.

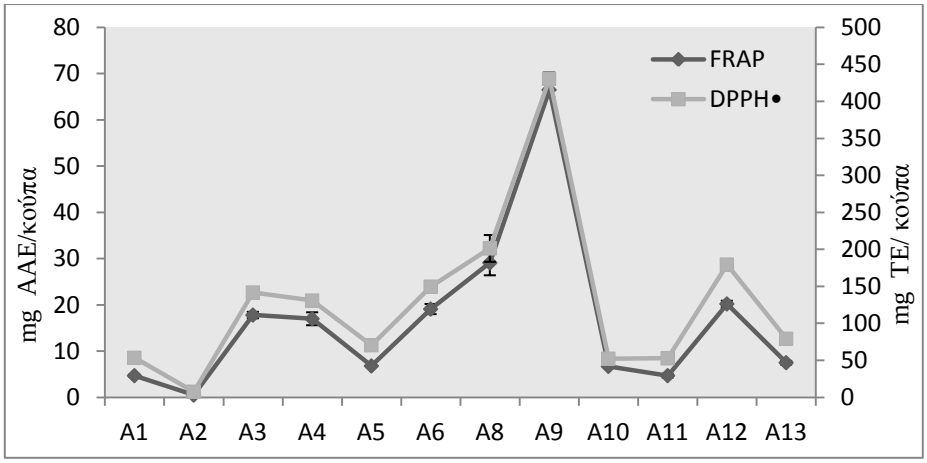
Όλα τα αφεψήματα των βοτάνων περιείχαν επίσης συστατικά ικανά να λειτουργούν και ως δότες ηλεκτρονίων. Πιο ικανό βρέθηκε επίσης αφέψημα Μελισσόχορτου παρουσιάζοντας αναγωγική δύναμη 519.9±13.1 mg ισοδυνάμων ασκορβικού οξέος (AAE)/κούπα, ακολουθούμενο από το αφέψημα Σπαθόχορτου, το οποίο συγκριτικά παρουσίασε πολύ χαμηλότερη αναγωγική δύναμη (66.5±2.7 mg AAE/κούπα). Για τα υπόλοιπα βότανα οι τιμές κυμάνθηκαν μεταξύ 0.5-29.1 (Διάγραμμα 3.2) Η σειρά φθίνουσας κατάταξης των βοτάνων,

αναφορικά με την αντιοξειδωτική τους δράση, βρέθηκε πανομοιότυπη στις δυο μεθόδους και είχε ως εξής: Μελισσόχορτο > Σπαθόχορτο > Ρίγανη > Φλισκούνι > Μαντζουράνα > Δίκταμο > Θρύμπα > Χαμομήλι > Θυμάρι > Τσάι βουνού > Αντωναΐδα > Φασκόμηλο > Δενδρολίβανο. Στο αφέψημα Μελισσόχορτου, η συγκέντρωση αναγωγικών παραγόντων και παραγόντων δέσμευσης ελευθέρων ριζών ήταν παρόμοια (469.8±0.79 mg TE/κούπα και 519.9±13.1 mg AAE/κούπα), ενώ για τα υπόλοιπα αφεψήματα, ανάλογη. Η παραπάνω σχέση παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 3.3.



*Όπου A1: Αντωναΐδα, A2: Δενδρολίβανο, A3: Δίκταμο, A4: Θρύμπα, A5: Θυμάρι, A6: Μαντζουράνα, A7: Μελισσόχορτο, A8: Ρίγανη, A9: Σπαθόχορτο, A10: Τσάι βουνού, A11: Φασκόμηλο, A12: Φλισκούνι, A13: Χαμομήλι, *κούπα: 200 mL, *TE: ισοδύναμα Trolox, * AAE: ισοδύναμα ασκορβικού οξέος

Διάγραμμα 3.2 Αντιοξειδωτική ικανότητα των αφεψημάτων εκτιμώμενη με τις μεθόδους DPPH$^{\bullet}$ και FRAP, εκφρασμένη σε mg TE και mg AAE ανά κούπα (μ. όροι± s.d τριών προσδιορισμών)

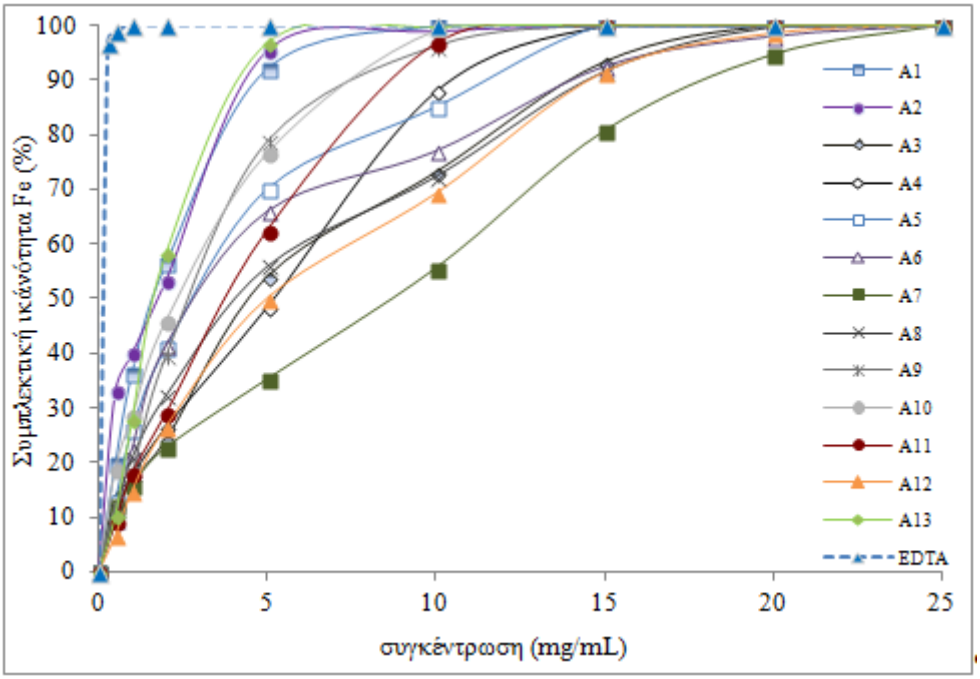


*Όπου A1: Αντωναΐδα, A2: Δενδρολίβανο, A3: Δίκταμο, A4: Θρύμπα, A5: Θυμάρι, A6: Μαντζουράνα, A8: Ρίγανη, A9: Σπαθόχορτο, A10: Τσάι βουνού, A11: Φασκόμηλο, A12: Φλισκούνι, A13: Χαμομήλι, *κούπα: 200 mL, *TE: ισοδύναμα Trolox, * AAE: ισοδύναμα ασκορβικού οξέος

Διάγραμμα 3.3 Αντιοξειδωτική ικανότητα των αφεψημάτων, πλην του Μελισσόχορτου, εκτιμώμενη με τις μεθόδους DPPH$^{\bullet}$ και FRAP, εκφρασμένη σε mg TE και mg AAE ανά κούπα (μ. όροι± s.d τριών προσδιορισμών)

3.2.1.2 Ικανότητα Δημιουργίας Χηλικών Συμπλόκων με κατιόντα μετάλλων στοιχείων μετάπτωσης

Η εκτίμηση της ικανότητας των αφεψημάτων να δημιουργούν χηλικά σύμπλοκα με ιόντα μετάλλων, πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στις Ενότητες 2.5.3 και 2.5.4. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν αναφορικά με την ικανότητα σύμπλεξης κατιόντων Fe^{++} του συνόλου των αφεψημάτων, συγκριτικά με το θετικό μάρτυρα (EDTA) παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3.4. Όλα τα βότανα περιέχουν συστατικά ικανά να συμπλέξουν το Fe^{++}. Η Αντωναΐδα περιείχε τους ισχυρότερους παράγοντες σύμπλεξης Fe^{++} (mg/mL), ενώ ακολούθησε το αφέψημα Χαμομηλιού και Σιδερίτη. Τελευταίο στην κατάταξη βρέθηκε το αφέψημα Μελισσόχορτου (έκφραση των αποτελεσμάτων σε mg/mL).



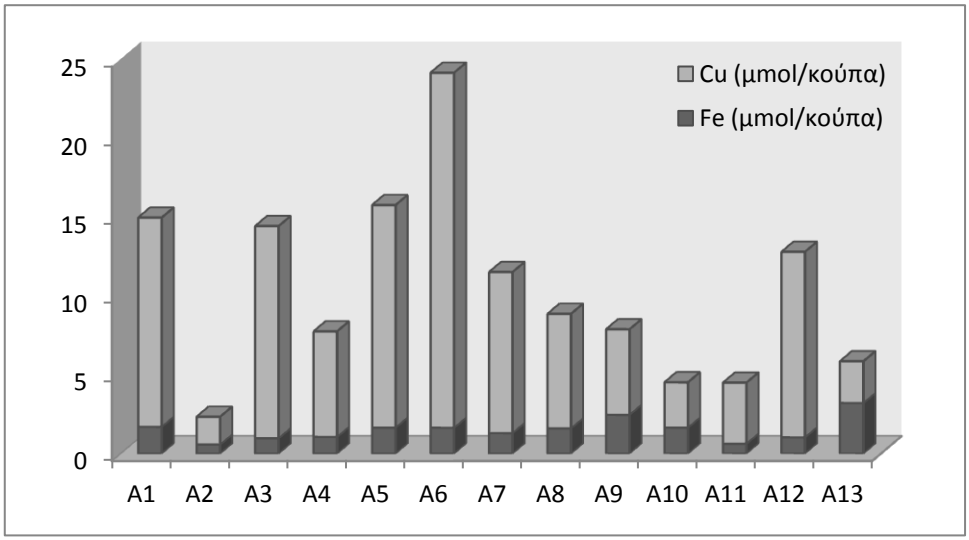
*Όπου Α1: Αντωναΐδα, Α2: Δενδρολίβανο, Α3: Δίκταμο, Α4: Θρύμπα, Α5: Θυμάρι, Α6: Μαντζουράνα, Α7: Μελισσόχορτο, Α8: Ρίγανη, Α9: Σπαθόχορτο, Α10: Τσάι βουνού, Α11: Φασκόμηλο, Α12: Φλισκούνι, Α13: Χαμομήλι

Διάγραμμα 3.4 Ικανότητα δημιουργίας χηλικών συμπλόκων με κατιόντα Fe^{++} από τα αφεψήματα της μελέτης, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, συγκριτικά με το θετικό μάρτυρα EDTA. Η έκφραση των αποτελεσμάτων έγινε σε mg/mL (μ. όροι± s.d τριών προσδιορισμών)

Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων από διατροφικής σκοπιάς, η ικανότητα σύμπλεξης κατιόντων Fe^{++} από τα αφεψήματα της μελέτης, υπολογίσθηκε στη συνέχεια ως μmol/κούπα (Διάγραμμα 3.5). Σύμφωνα με αυτή την έκφραση (η ικανότητα σύμπλεξη Fe κυμάνθηκε μεταξύ 0.57-3.21 μmol/κούπα), τα αφεψήματα κατατάχθηκαν με σειρά φθίνουσας δραστικότητας ως εξής: Χαμομήλι > Σπαθόχορτο > Αντωναΐδα > Τσάι βουνού > Θυμάρι > Μαντζουράνα >

Ρίγανη > Μελισσόχορτο > Θρύμπα > Φλισκούνι > Δίκταμο > Φασκόμηλο > Δενδρολίβανο. Η μεταβολή στην σειρά κατάταξή που παρατηρήθηκε, σχετίστηκε με τις αποδόσεις των βοτάνων σε στερεό υπόλειμμα (Πίνακες 3.1Α και 3.1Β). Από την παρατήρηση αυτή προέκυψε ότι, το αφέψημα Χαμομηλιού ήταν το πιο δραστικό αναφορικά με την ικανότητα σύμπλεξης Fe^{++}, ενώ το αφέψημα Μελισσόχορτου περιείχε τους περισσότερους παράγοντες σύμπλεξης του ίδιου μετάλλου.

Τα αφεψήματα περιείχαν επίσης παράγοντες σύμπλεξης (υποκαταστάτες) κατιόντων Cu^{++}, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 3.5. Μάλιστα, η ικανότητα σύμπλεξης του συγκεκριμένου μετάλλου, εκφρασμένη σε μmol/κούπα, ήταν μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του Fe^{++}, με εξαίρεση το αφέψημα Χαμομηλιού. Το αφέψημα Μαντζουράνας περιείχε τους περισσότερους παράγοντες σύμπλεξης Cu^{++} (22.49 μmol/κούπα), ενώ του Δενδρολίβανο τους λιγότερους (1.76 μmol/κούπα). Συμπερασματικά φάνηκε ότι, διαφορετικά συστατικά των αφεψημάτων ήταν υπεύθυνα για τη σύμπλεξη των δυο μετάλλων.



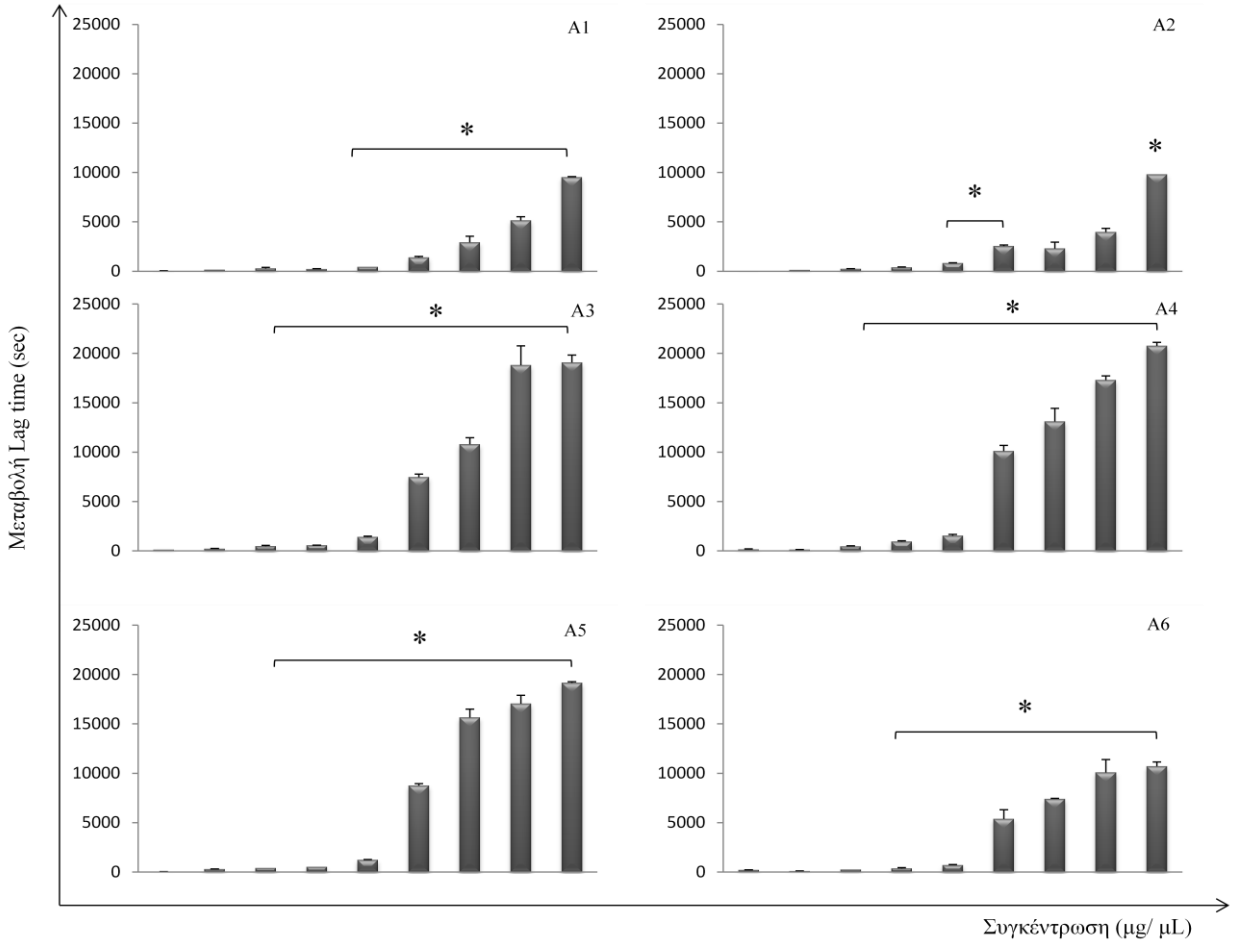
*Όπου Α1: Αντωναΐδα, Α2: Δενδρολίβανο, Α3: Δίκταμο, Α4: Θρύμπα, Α5: Θυμάρι, Α6: Μαντζουράνα, Α7: Μελισσόχορτο, Α8: Ρίγανη, Α9: Σπαθόχορτο, Α10: Τσάι βουνού, Α11: Φασκόμηλο, Α12: Φλισκούνι, Α13: Χαμομήλι, *κούπα: 200 mL

Διάγραμμα 3.5 Ικανότητα δημιουργίας χηλικών συμπλόκων με κατιόντα Fe^{++} και Cu^{++} από τα αφεψήματα της μελέτης, εκφρασμένη σε μmol/κούπα

3.2.1.3 In Vitro Οξειδωτική Τροποποίηση των Λιποπρωτεϊνών του Ορού με Ιόντα Χαλκού

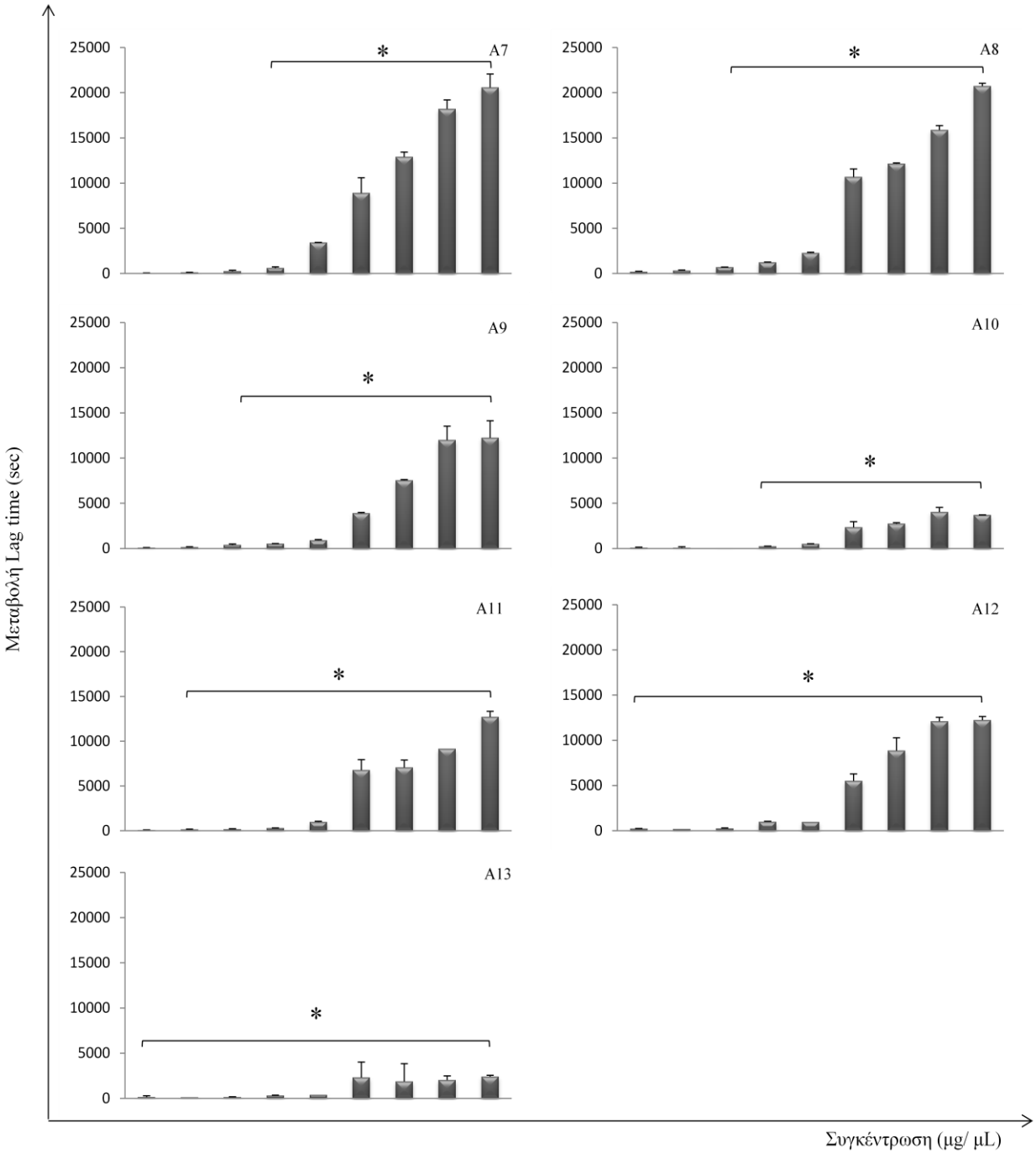
Από την εξέταση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι στο σύνολό τους τα αφεψήματα ανέστειλαν την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών του ορού με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο (Διαγράμματα 3.6Α και 3.6Β). Πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση παρουσίασαν τα αφεψήματα Ρίγανης, Μελισσόχορτου και Θρύμπας στη συγκέντρωση 1 μg/μL καθώς και του Δίκταμου, ήδη από τη συγκέντρωση 0.75

μg/μL. Κορεσμός του φαινομένου, παρατηρήθηκε επίσης για τα αφεψήματα Μαντζουράνας (0.75 μg/μL), Σπαθόχορτου (0.75 μg/μL), Σιδερίτη (0.25 μg/μL), Φλισκουνιού (0.75 μg/μL) και Χαμομηλιού (0.25 μg/μL), επιδεικνύοντας ωστόσο μειωμένη ικανότητα αναστολής της οξείδωσης των λιποπρωτεϊνών του ορού, σε σχέση με τα προαναφερθέντα. Φάνηκε επίσης ότι η ικανότητά τους να εκδηλώνουν αντιοξειδωτική δράση σχετίζεται με ένα κατώφλι συγκέντρωσης, καθώς στην πλειοψηφία τους βρέθηκαν δραστικά σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 0.01 μg/μL. Η παρατήρηση αυτή έγινε έντονα εμφανής όταν μελετήθηκε η δράση του συνόλου των αφεψημάτων, με εξαίρεση αυτών από Φασκόμηλο, Φλισκούνι και Χαμομήλι, καθώς δεν προκάλεσαν στατιστικά σημαντική μεταβολή του χρόνου οξείδωσης στις συγκεντρώσεις 0.0025 και 0.005 μg/μL.



*Όπου A1: Αντωναΐδα, A2: Δενδρολίβανο, A3: Δίκταμο, A4: Θρύμπα, A5: Θυμάρι, A6: Μαντζουράνα

Διάγραμμα 3.6A Επίδραση των αφεψημάτων στο χρόνο οξείδωσης των λιποπρωτεϊνών του ορού. Ο (*) δηλώνει τη στατιστικά σημαντική μεταβολή της αύξησης του Lag time (sec) ($p < 0.05$), σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα. Οι τιμές είναι μ. όροι± s.d τριών προσδιορισμών. Υπό μελέτη συγκεντρώσεις: 0.0025, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.25, 0.5, 0.75, 1 μg/μL



*Όπου Α7: Μελισσόχορτο, Α8: Ρίγανη, Α9: Σπαθόχορτο, Α10: Τσάι βουνού, Α11: Φασκόμηλο, Α12: Φλισκούνι, Α13: Χαμομήλι

Διάγραμμα 3.6Β Επίδραση των αφεψημάτων στο χρόνο οξείδωσης των λιποπρωτεϊνών του ορού. Ο (*) δηλώνει τη στατιστικά σημαντική μεταβολή της αύξησης του Lag time (sec) ($p < 0.05$), σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα. Οι τιμές είναι μ. όροι± s.d τριών προσδιορισμών. Υπό μελέτη συγκεντρώσεις: 0.0025, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.25, 0.5, 0.75, 1 μg/μL (Συνέχεια)

3.2.2 Μελέτη της Επίδρασης των Αφεψημάτων σε Κύτταρα του Περιφερικού Αίματος (PBMCs)

Η συμμετοχή της φλεγμονώδους αντίδρασης στην έναρξη και εξέλιξη των καρδιαγγειακών νοσημάτων έχει μελετηθεί και επιβεβαιωθεί εκτενώς (Ενότητα 1.7). Η έκφραση μορίων προφλεγμονωδών κυτταροκινών από τα PBMCs, όπως ο TNF-α και η IL6, επάγει την έκφραση μορίων προσκόλλησης, με αποτέλεσμα τη μετανάστευσή τους στον έσω χιτώνα του ενδοθηλίου. Επιπρόσθετα τα ίδια κύτταρα εκφράζουν και εκκρίνουν μόρια που επάγουν το χημειοτακτισμό, όπως η MCP-1, με αποτέλεσμα τη συσσώρευσή τους στο σημείο της βλάβης και την αύξηση της έντασης του φαινομένου. Προκειμένου να μελετηθεί η αντιαθηρογόνος δράση των αφεψημάτων των βοτάνων, μέσω της εκτίμησης των επιπέδων TNF-α, IL6 και MCP-1, στην επαγόμενη με LPS φλεγμονή σε PBMCs, στα κύτταρα επέδρασαν: (α) το LPS, ως διεγέρτης της φλεγμονώδους αντίδρασης (θετικός μάρτυρας), (β) τα αφεψήματα των βοτάνων παρουσία διεγέρτη και (γ) κανένας παράγοντας (αρνητικός μάρτυρας). Πριν γίνει ο έλεγχος της αντιφλεγμονώδους δράσης των αφεψημάτων ελέγχθηκε η τοξικότητα των δειγμάτων στα PBMCs σε διάφορες συγκεντρώσεις.

3.2.2.1 Επίδραση των Αφεψημάτων στη Βιωσιμότητα των Κυττάρων

Η τοξικότητα των αφεψημάτων στα PBMCs εκτιμήθηκε μέσω αξιολόγησης των επιπέδων της LDH (Ενότητα 2.8.1). Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στους Πίνακες 3.5A και 3.5B φάνηκε ότι, η πλειοψηφία των αφεψημάτων δεν επιδρά στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Εξαίρεση ήταν το αφέψημα Αντωναΐδας, για το οποίο η μείωση της βιωσιμότητας των PBMCs καταγράφηκε ≥ 10 %. Λόγω καταγραφής κυτταρικού θανάτου από το αφέψημα της Αντωναΐδας (≥ 10 % για συγκεντρώσεις 1-2 μg/μL), αποφασίσθηκε η χρήση των συγκεντρώσεων 0.05, 0.1, 0.2 και 0.5 μg/μL, για την περαιτέρω εκτίμηση της δράσης τους επί των PBMCs.

Πίνακας 3.5A Επίδραση των αφεψημάτων των βοτάνων στα επίπεδα βιωσιμότητας των PBMCs

	A1	A2	A3	A4	A5	A6
< 10%	0.2-1 μg/μL	1-2 μg/μL	2 μg/μL	1-2 μg/μL	2 μg/μL	n.d
≥ 10 %	1-2 μg/μL	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

*Οπου A1: Αντωναΐδα, A2: Δενδρολίβανο, A3: Δίκταμο, A4: Θρύμπα, A5: Θυμάρι, A6: Μαντζουράνα, *n.d: δεν παρατηρήθηκε

Πίνακας 3.5Β Επίδραση των αφεψημάτων των βοτάνων στα επίπεδα βιωσιμότητας των PBMCs (Συνέχεια)

	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13
< 10%	n.d	n.d	n.d	2 μg/μL	2 μg/μL	n.d	n.d
≥ 10 %	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

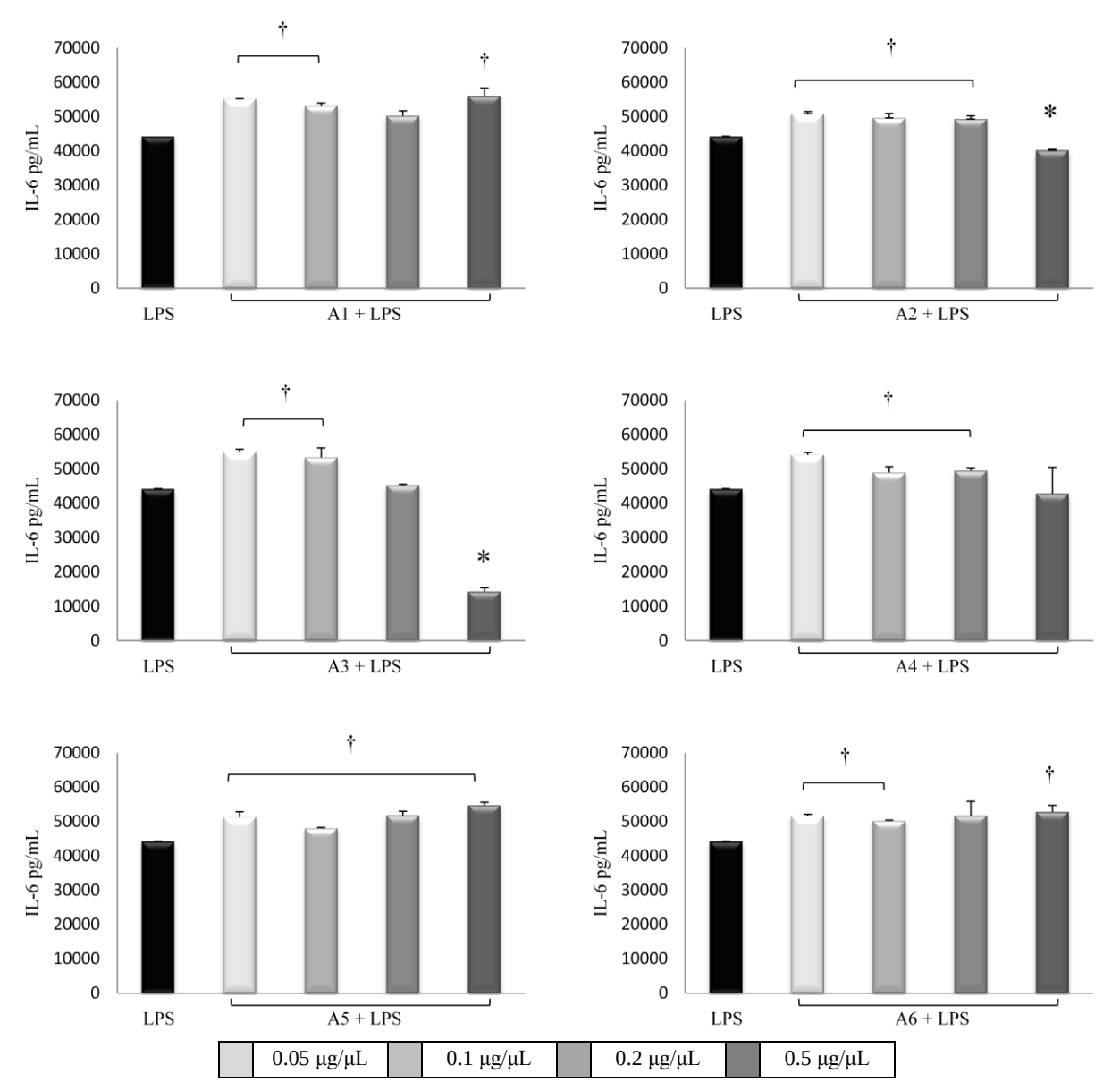
*Όπου A7: Μελισσόχορτο, A8: Ρίγανη, A9: Σπαθόχορτο, A10: Τσάι βουνού, A11: Φασκόμηλο, A12: Φλισκούνι, A13: Χαμομήλι, *n.d: δεν παρατηρήθηκε

3.2.2.2 Επίδραση των Αφεψημάτων στα Επίπεδα Έκκρισης της Ιντερλευκίνης-6 (IL-6)

Το λιποπολυσακχαρίδιο (LPS) προκάλεσε επαγωγή της διαδικασίας της φλεγμονής, καθώς η προσθήκη του σε PBMCs διέγειρε τα κύτταρα με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων έκκρισης της κυτταροκίνης IL-6 (επίπεδα αρνητικού μάρτυρα: 31.2 ng/mL, επίπεδα θετικού μάρτυρα 44.2 ng/mL).

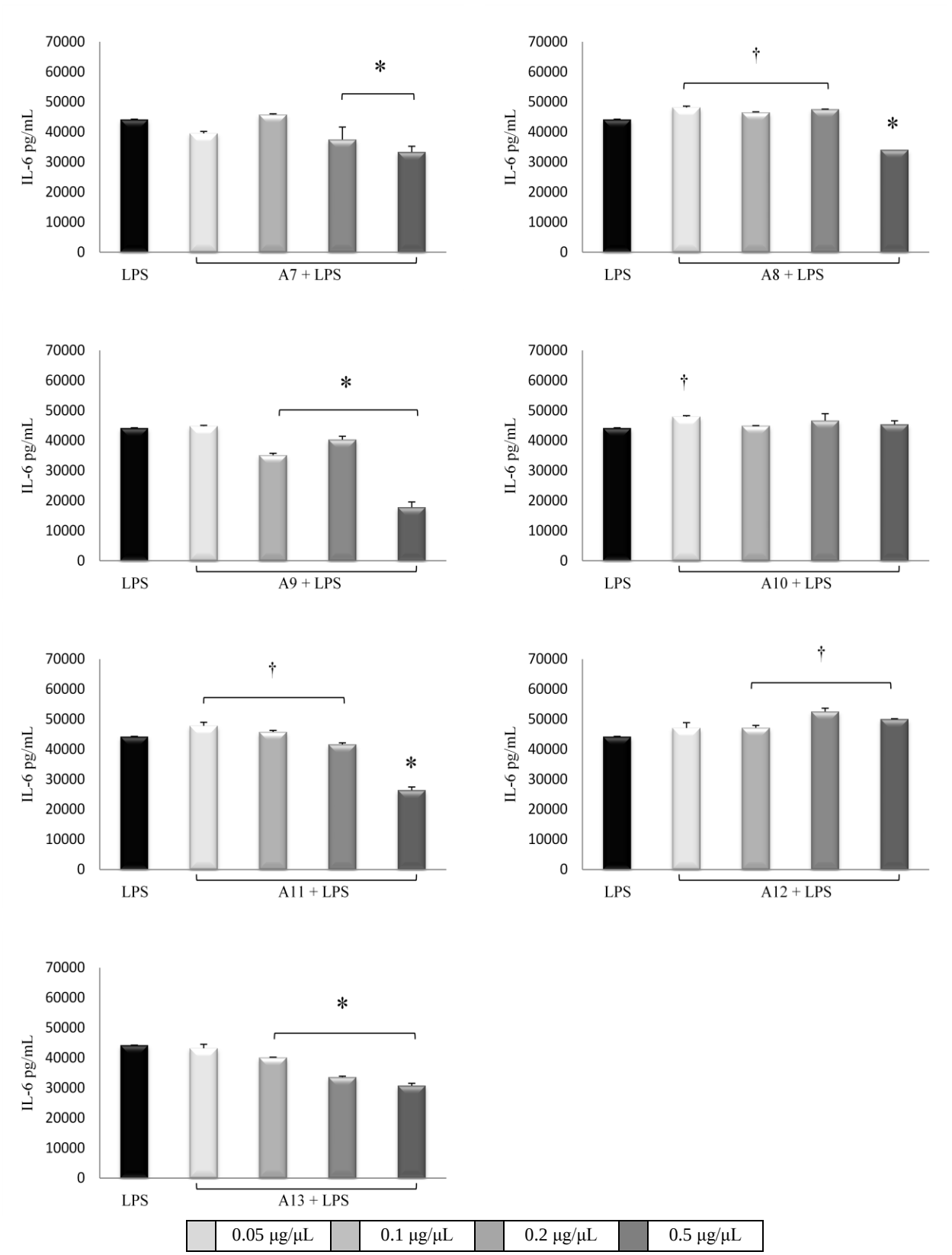
Η τροποποίηση των επιπέδων έκκρισης της IL-6 από διεγερμένα κύτταρα περιφερικού αίματος βρέθηκε εξαρτώμενη από το είδος και τη συγκέντρωση του αφεψήματος με το οποίο πραγματοποιήθηκε η επίδραση (Διαγράμματα 3.7Α και 3.7Β). Το σύνολο των αφεψημάτων βρέθηκε να επάγει την έκκριση της IL-6 στις συγκεντρώσεις 0.05 και 0.1 μg/μL, επιδεικνύοντας προφλεγμονώδη δράση. Η επαγωγή του φαινομένου σημειώθηκε εντονότερα για τα αφεψήματα Δίκταμου, Θρύμπας και Θυμαριού. Ωστόσο, το αφέψημα Δίκταμου σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (0.5 μg/μL) επέδειξε πολύ ισχυρή, αντιφλεγμονώδη δράση, καθώς προκάλεσε μείωση μεγαλύτερη από 50 % στα επίπεδα της κυτταροκίνης. Η ίδια παρατήρηση φάνηκε έγκυρη για τα αφεψήματα Δενδρολίβανου, Μελισσόχορτου, Ρίγανης και Φασκόμηλου. Επιπρόσθετα, για τα αφεψήματα από Αντωναΐδα, Θρύμπα, Θυμάρι, Μαντζουράνα, Τσάι βουνού και Φλισκούνι σημειώθηκε αποκλείστηκα αύξηση των επιπέδων έκκρισης της IL-6, στο σύνολο των συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν, με την εφαρμογή του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου.

Ευεργετική δράση, μειώνοντας την επαγόμενη φλεγμονή σημειώθηκε για τα αφεψήματα Μελισσόχορτου, Σπαθόχορτου και Χαμομηλιού. Η μείωση των επιπέδων της κυτταροκίνης από τα προαναφερθέντα αφεψήματα βοτάνων ήταν στατιστικά σημαντική. Ταυτόχρονα, η δράση των αφεψημάτων αυτών φάνηκε να παρουσιάζει σχέση δόσης- απόκρισης. Ειδικότερα, τα αφεψήματα από Σπαθόχορτο και Χαμομήλι ανέστειλαν αναλογικά της συγκέντρωσης την εκκρινόμενη ποσότητα IL-6, με εξαίρεση τη συγκέντρωση των 0.05 μg/μL για την οποία δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή.



*Όπου A1: Αντωναΐδα, A2: Δενδρολίβανο, A3: Δίκταμο, A4: Θρύμπα, A5: Θυμάρι, A6: Μαντζουράνα

Διάγραμμα 3.7A Επίδραση των αφεψημάτων στα επίπεδα της IL-6 σε διεγερμένα PBMCs έπειτα από επώαση 24 h. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική μείωση ($P < 0.05$), ενώ ο (†) στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της IL-6 μεταξύ των κυττάρων στα οποία έχει επιδράσει το LPS (θετικός μάρτυρας) και εκείνων στα οποία είχαν επιδράσει τα αφεψήματα των βοτάνων. Οι τιμές είναι μ. όροι± s.d τριών προσδιορισμών



*Όπου Α7: Μελισσόχορτο, Α8: Ρίγανη, Α9: Σπαθόχορτο, Α10: Τσάι βουνού, Α11: Φασκόμηλο, Α12: Φλισκούνι, Α13: Χαμομήλι

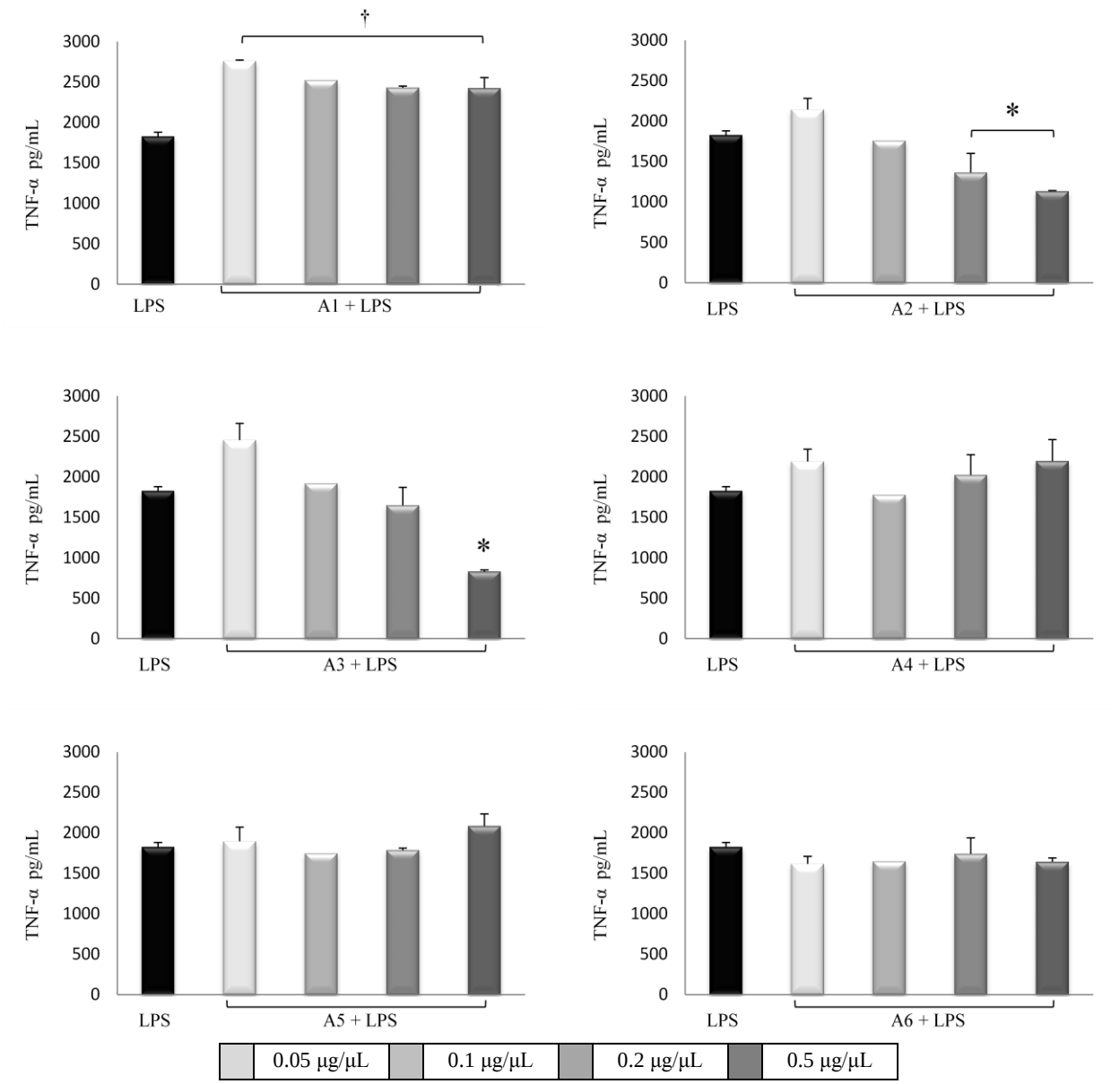
Διάγραμμα 3.7Α Επίδραση των αφεψημάτων στα επίπεδα της IL-6 σε διεγερμένα PBMCs έπειτα από επώαση 24 h. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική μείωση ($P < 0.05$), ενώ ο (†) στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της IL-6 μεταξύ των κυττάρων στα οποία έχει επιδράσει το LPS (θετικός μάρτυρας) και εκείνων στα οποία είχαν επιδράσει τα αφεψήματα των βοτάνων. Οι τιμές είναι μ. όροι± s.d τριών προσδιορισμών (Συνέχεια)

3.2.2.3 Επίδραση των Αφεψημάτων στα Επίπεδα Έκκρισης του Παράγοντα Νέκρωσης Όγκων (TNF-α)

Η προσθήκη του λιποπολυσακχαριδίου (LPS), η οποία οδήγησε στην επαγωγή ενός μοντέλου φλεγμονής, προκάλεσε (ομοίως με την IL-6) αύξηση των επιπέδων έκκρισης του TNF-α (επίπεδα αρνητικού μάρτυρα: 1.2 ng/mL, επίπεδα θετικού μάρτυρα 1.8 ng/mL).

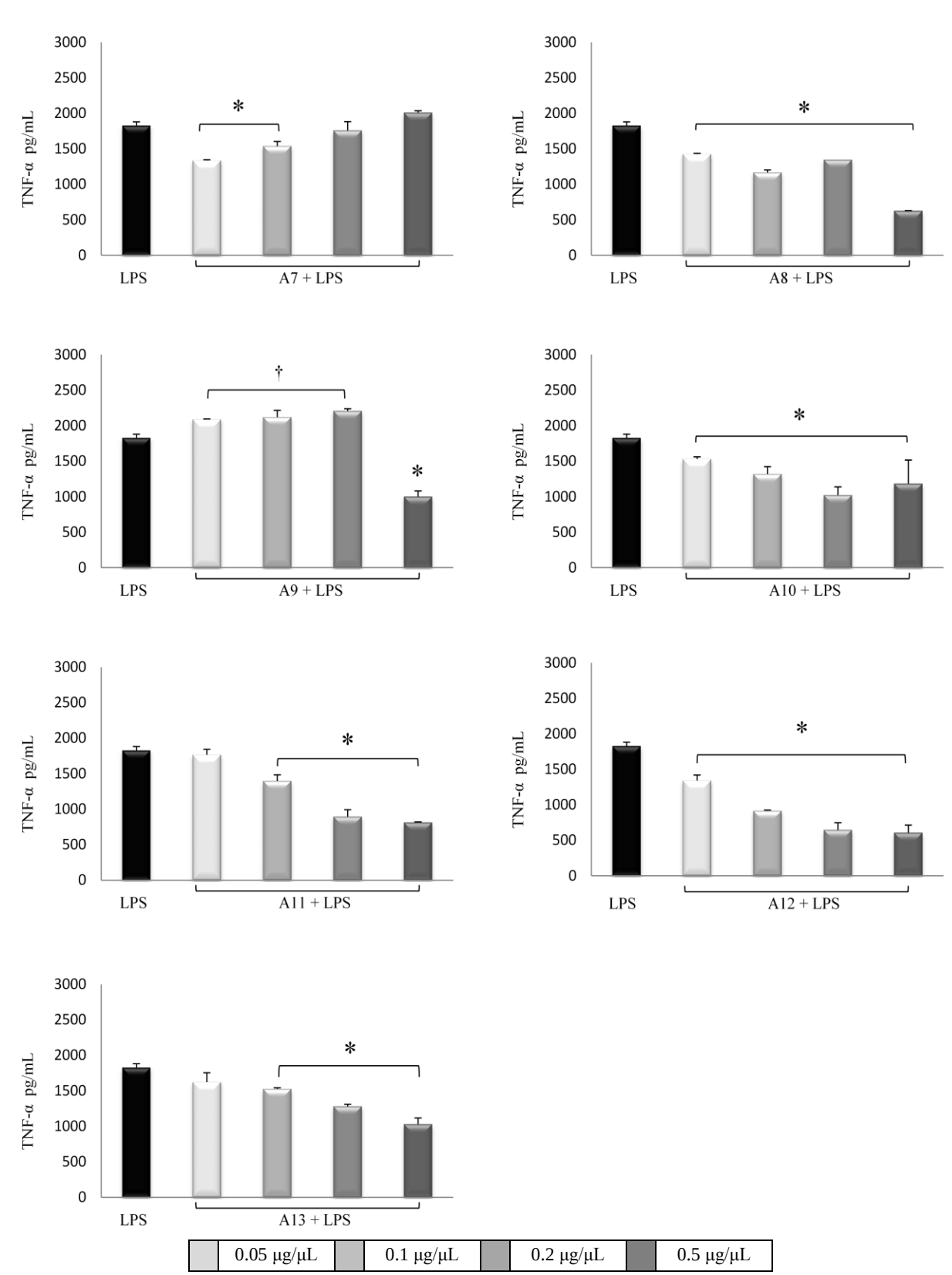
Τα περισσότερα αφεψήματα των βοτάνων τροποποίησαν τα επίπεδα έκκρισης του TNF-α διεγερμένων PBMCs. Ειδικότερα, με εξαίρεση τα αφεψήματα Δίκταμου, Θρύμπας, Θυμαριού και Μαντζουράνας τα οποία δεν προκάλεσαν καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή, όλα τα υπόλοιπα βότανα προκάλεσαν μείωση ή/ και αύξηση των επιπέδων της κυτταροκίνης (Διαγράμματα 3.8Α και 3.8Β). Πιο αναλυτικά, η μεγαλύτερη αρνητική επίδραση ασκήθηκε από το Φλισκούνι και τη Ρίγανη. Ειδικότερα, η μείωση που παρατηρήθηκε για τα δύο προαναφερθέντα βότανα (0.5 μg/μL) ήταν της τάξης του 67 % και 66 % αντίστοιχα. Η παρουσία των συγκεκριμένων αφεψημάτων σε καλλιέργεια διεγερμένων κυττάρων οδήγησε σε μείωση των επίπεδων έκκρισης του TNF-α κατά 50 % (τα δεδομένα δε δίνονται στα διαγράμματα) εν συγκρίσει με τα αντίστοιχα επίπεδα μη διεγερμένων κυττάρων (αρνητικός μάρτυρας). Επιπρόσθετα, η δράση του αφεψήματος από Φλισκούνι φάνηκε να παρουσιάζει σχέση δόσης-απόκρισης. Δοσοεξαρτώμενη μεταβολή παρατηρήθηκε και για τα αφεψήματα από Φασκόμηλο και Χαμομήλι, με εξαίρεση τη συγκέντρωση των 0.05 μg/μL για την οποία δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή. Τέλος, παρατηρήθηκε μείωση στα επίπεδα του TNF-α ύστερα από επώαση των κυττάρων με αφέψημα Σιδερίτη σε όλες τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν, ενώ για το αφέψημα Δενδρολίβανου η μείωση σημειώθηκε μόνο για τις συγκεντρώσεις 0.2 και 0.5 μg/μL.

Αντίθετα, τα αφεψήματα Αντωναΐδας, Σπαθόχορτου και Μελισσόχορτου προκάλεσαν επαγωγή της έκκρισης του TNF-α σε ορισμένες ή στο σύνολο των συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν. Συγκεκριμένα, η προφλεγμονώδης δράση των αφεψημάτων σημειώθηκε για το σύνολο των συγκεντρώσεων, τις συγκεντρώσεις 0.05-0.2 μg/μL και τις συγκεντρώσεις 0.2 και 0.5 μg/μL, αντίστοιχα.



*Όπου A1: Αντωναΐδα, A2: Δενδρολίβανο, A3: Δίκταμο, A4: Θρύμπα, A5: Θυμάρι, A6: Μαντζουράνα

Διάγραμμα 3.8A Επίδραση των αφεψημάτων στα επίπεδα του TNF-α σε διεγερμένα PBMCs έπειτα από επώαση 24 h. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική μείωση ($P < 0.05$), ενώ ο (†) στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του TNF-α μεταξύ των κυττάρων στα οποία έχει επιδράσει το LPS (θετικός μάρτυρας) και εκείνων στα οποία είχαν επιδράσει τα αφεψήματα των βοτάνων. Οι τιμές είναι μ. όροι± s.d τριών προσδιορισμών



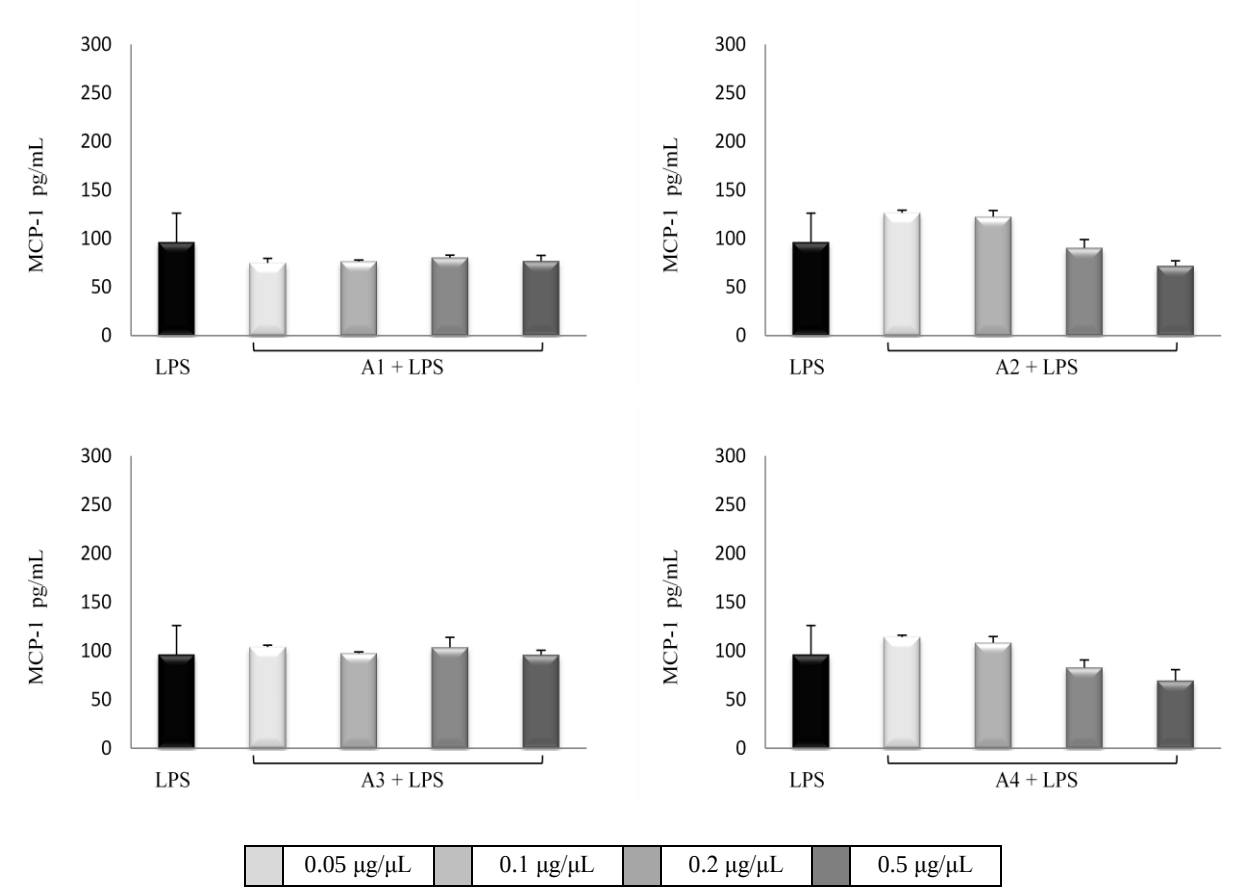
*Όπου Α7: Μελισσόχορτο, Α8: Ρίγανη, Α9: Σπαθόχορτο, Α10: Τσάι βουνού, Α11: Φασκόμηλο, Α12: Φλισκούνι, Α13: Χαμομήλι

Διάγραμμα 3.8Β Επίδραση των αφεψημάτων στα επίπεδα του TNF-α σε διεγερμένα PBMCs έπειτα από επώαση 24 h. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική μείωση ($P < 0.05$), ενώ ο (†) στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του TNF-α μεταξύ των κυττάρων στα οποία έχει επιδράσει το LPS (θετικός μάρτυρας) και εκείνων στα οποία είχαν επιδράσει τα αφεψήματα των βοτάνων. Οι τιμές είναι μ. όροι± s.d τριών προσδιορισμών (Συνέχεια)

3.2.2.4 Επίδραση των Αφεψημάτων στα Επίπεδα Έκκρισης της Χημειοτακτικής Πρωτεΐνης Μονοκυττάρων (MCP-1)

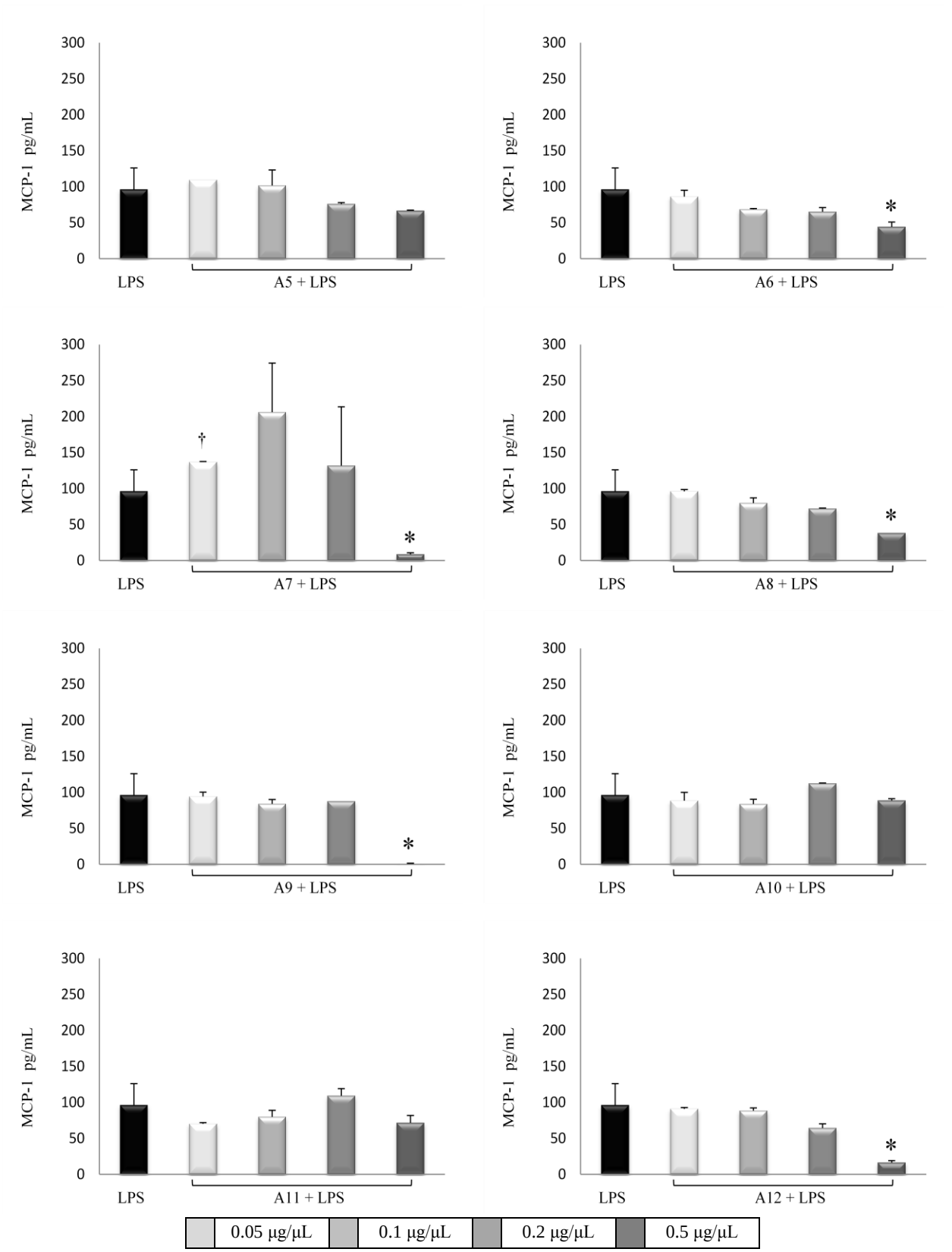
Η προσθήκη του λιποπολυσακχαριδίου (LPS) στα κύτταρα του περιφερικού αίματος προκάλεσε τη μερική αύξηση των επιπέδων έκκρισης της MCP-1 (επίπεδα αρνητικού μάρτυρα: 90 pg/mL, επίπεδα θετικού μάρτυρα 100 pg/mL).

Με εξαίρεση τα αφεψήματα από Μαντζουράνα, Μελισσόχορτο, Ρίγανη, Σπαθόχορτο, Φλισκούνι και Χαμομήλι, τα υπόλοιπα βότανα της μελέτης δεν τροποποίησαν τα επίπεδα έκφρασης της MCP-1 στα διεγερμένα PBMCs (Διαγράμματα 3.9Α, 3.9Β και 3.9Γ). Από τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν, η επώαση με 0.5 μg/μL φάνηκε να προκαλεί στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων της χημειοκίνης (και η 0.2 μg/μL μόνο για το Χαμομήλι). Το Σπαθόχορτο ήταν το πιο δραστικό, μειώνοντας τα επίπεδα της MCP-1 στα όρια ανίχνευσης της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της.



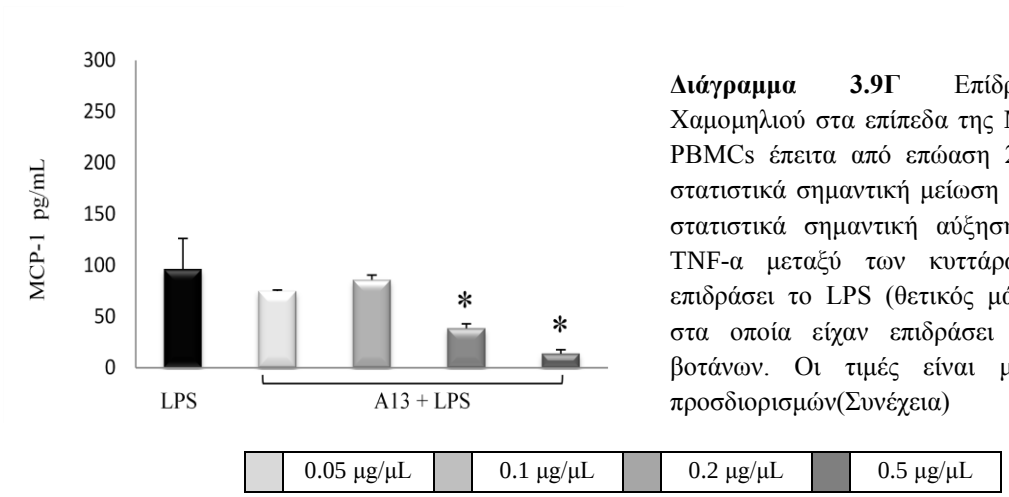
*Όπου A1: Αντωναΐδα, A2: Δενδρολίβανο, A3: Δίκταμο, A4: Θρύμπα

Διάγραμμα 3.9Α Επίδραση των αφεψημάτων στα επίπεδα της MCP-1 σε διεγερμένα PBMCs έπειτα από επώαση 24 h. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική μείωση ($P < 0.05$), ενώ ο (†) στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του TNF-α μεταξύ των κυττάρων στα οποία έχει επιδράσει το LPS (θετικός μάρτυρας) και εκείνων στα οποία είχαν επιδράσει τα αφεψήματα των βοτάνων. Οι τιμές είναι μ. όροι± s.d τριών προσδιορισμών



*Όπου Α5: Θυμάρι, Α6: Μαντζουράνα, Α7: Μελισσόχορτο, Α8: Ρίγανη, Α9: Σπαθόχορτο, Α10: Τσάι βουνού, Α11: Φασκόμηλο, Α12: Φλισκούνι

Διάγραμμα 3.9Β Επίδραση των αφεψημάτων στα επίπεδα της MCP-1 σε διεγερμένα PBMCs έπειτα από επώαση 24 h. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική μείωση ($P < 0.05$), ενώ ο (†) στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του TNF-α μεταξύ των κυττάρων στα οποία έχει επιδράσει το LPS (θετικός μάρτυρας) και εκείνων στα οποία είχαν επιδράσει τα αφεψήματα των βοτάνων. Οι τιμές είναι μ. όροι± s.d τριών προσδιορισμών (Συνέχεια)



Διάγραμμα 3.9Γ Επίδραση αφεψήματος Χαμομηλιού στα επίπεδα της MCP-1 σε διεγερμένα PBMCs έπειτα από επώαση 24 h. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική μείωση ($P < 0.05$), ενώ ο (†) στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του TNF-α μεταξύ των κυττάρων στα οποία έχει επιδράσει το LPS (θετικός μάρτυρας) και εκείνων στα οποία είχαν επιδράσει τα αφεψήματα των βοτάνων. Οι τιμές είναι μ. όροι± s.d τριών προσδιορισμών(Συνέχεια)

3.2.3 Συσχέτιση Αντιοξειδωτικής και Αντιαθηρογόνου Δράσης των Αφεψημάτων με το Φαινολικό τους Περιεχόμενο

Η ικανότητα των αφεψημάτων να εκδηλώνουν αντιοξειδωτική δράση συσχετίστηκε ισχυρά με το φαινολικό τους περιεχόμενο. Ειδικότερα, η αναγωγική δύναμη εμφάνισε συντελεστή συσχέτισης R=0.908 ($P < 0.001$) με το σύνολο των πολυφαινολών και ειδικότερα με τα υδροξυ-κινναμωμικά οξέα, με κυριότερο το ροσμαρινικό οξύ (R=0.949, $P < 0.001$) και το τερπενικό οξύ, ολεανολικό οξύ (R=0.829, $P < 0.001$). Αντίστοιχα, η ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών παρουσίασε υψηλό βαθμό συσχέτισης R=0.931 ($P < 0.001$) με το φαινολικό περιεχόμενο των αφεψημάτων, συγκεκριμένα συσχετίστηκε με τα φαινολικά οξέαν (R=0.567, $P < 0.05$) και τα φλαβονοειδή (R=0.581, $P < 0.05$).

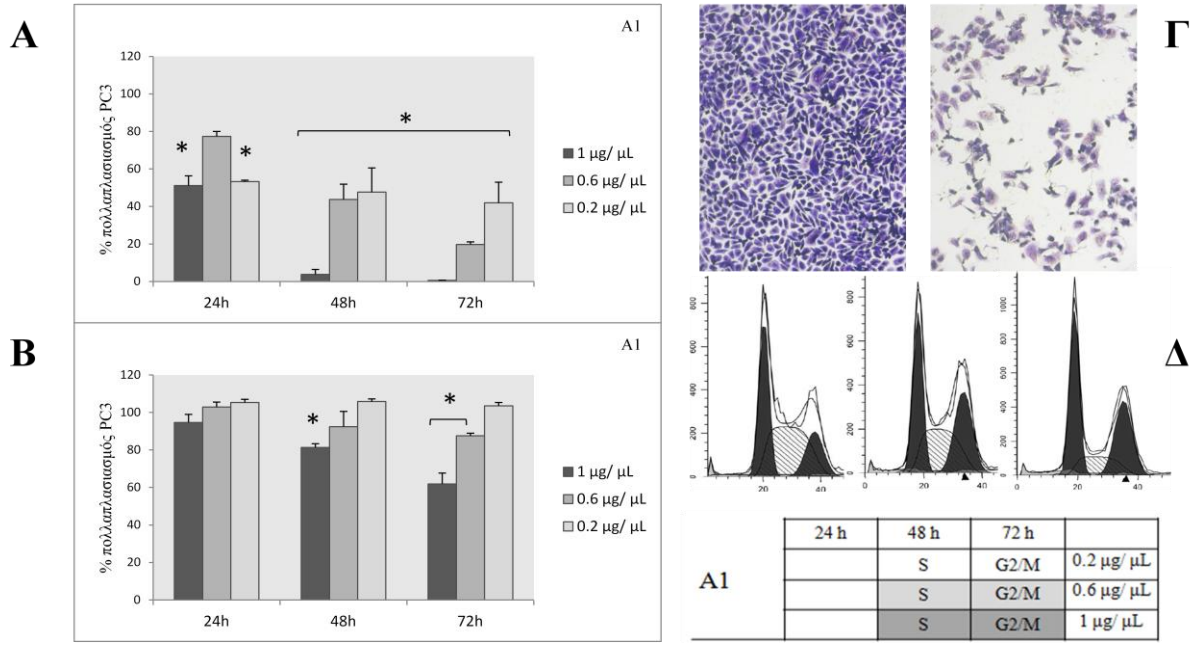
Η ικανότητα των αφεψημάτων να μειώνουν την εκκρινόμενη ποσότητα της IL-6 και του TNF-α διεγερμένων κυττάρων δε συσχετίστηκε ισχυρά με κανένα από τα φαινολικά συστατικά των αφεψημάτων. Ωστόσο στατιστικά σημαντικά ($P < 0.01$) συσχετίστηκε η αύξηση των επιπέδων έκκρισης της IL-6 με το συριγγικό οξύ (R=0.676) και τα υδροξυ-κινναμωμικά οξέα: *p*-κουμαρικό και σιναπικό (R=0.587 και 0.637, αντίστοιχα). Αντίθετα, το *p*-κουμαρικό οξύ βρέθηκε να σχετίζεται ($P < 0.05$) με τη μείωση που καταγράφηκε στα επίπεδα της MCP-1.

3.3 Μελέτη Επίδρασης των Αφεψημάτων σε Καρκινική Κυτταρική Σειρά του Προστάτη (PC3)

3.3.1 Επίδραση των Αφεψημάτων στον Πολλαπλασιασμό των Κυττάρων

Τα καρκινικά κύτταρα βρίσκονται συνεχώς υπό την «εντολή» πολλαπλασιασμού, λόγω της υπερέκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την επιβίωση και τη μιτωτική διαδικασία ή/ και την

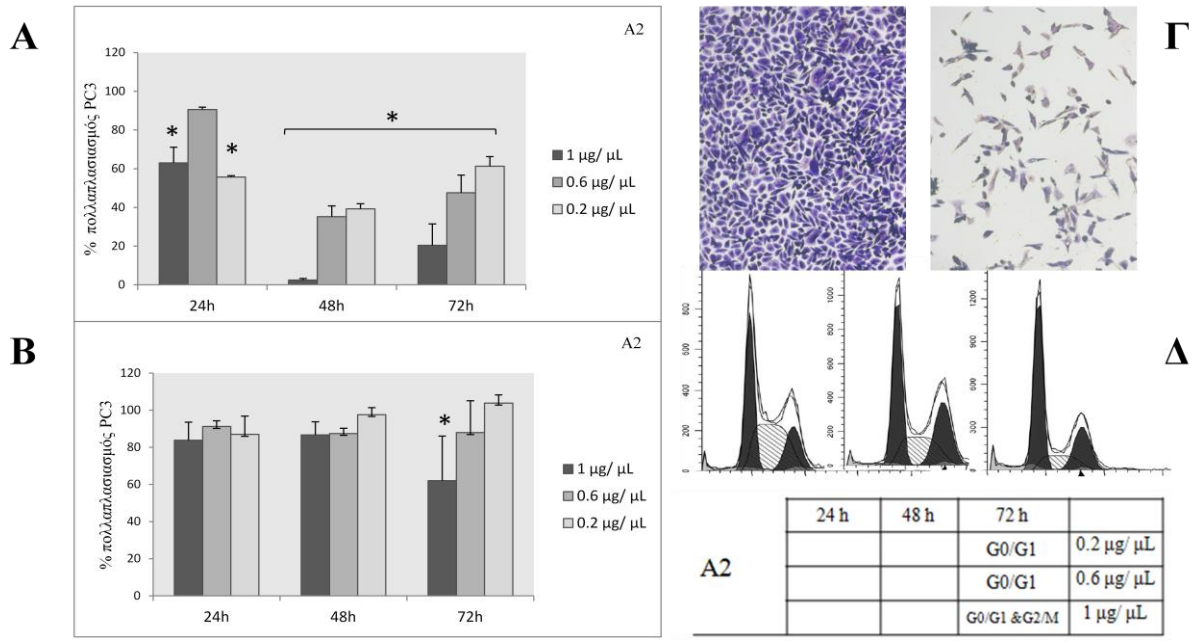
απενεργοποίηση γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό θάνατο. Φαρμακευτικές ουσίες με αντινεοπλασματική δράση στοχεύουν στην αναστολή του πολλαπλασιασμού (α) επεμβαίνοντας σε εξωγενή ερεθίσματα των κυττάρων που διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό, (β) παρεμποδίζοντας το σηματοδοτικό μονοπάτι που επάγει τη διαδικασία επιβίωσης (γ) ενεργοποιώντας τους καταρράκτες σηματοδότησης που οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο. Τα αφεψήματα βοτάνων μελετήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων PC3 σε διάφορες συγκεντρώσεις (0.2, 0.6 και 1 μg/μL) και χρόνους επώασης (24, 48 και 72 h). Στις Εικόνες 3.4-3.16 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του συνόλου των αναλύσεων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της επίδρασης των αφεψημάτων στην ανάπτυξη και στον κυτταρικό κύκλο κυττάρων PC3. Στο Παράρτημα ΙΙ παρουσιάζεται η εκατοστιαία κατανομή του πληθυσμού των κυττάρων στις φάσεις του κύκλου ανάπτυξης, απουσία αφεψήματων, όπως προέκυψε από την αξιολόγηση του συνόλου των πειραμάτων.



Εικόνα 3.4 Επίδραση αφεψήματος Αντωναΐδας στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των PC3. (Α) Αξιολόγηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, (Β) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Crystal Violet. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δε χορηγήθηκε το αφέψημα και θεωρήθηκαν ότι είχαν 100% πολλαπλασιασμό, και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα, για 24, 48 και 72 h, σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL. (Γ) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Giemsa παρουσία (1 μg/μL) (δεξιά) και απουσία (αριστερά) του αφεψήματος, t=72 h, (Δ) Επίδραση του αφεψήματος στον κυτταρικό κύκλο (1 μg/μL), στον πίνακα σημειώνονται οι φάσεις του κύκλου στις οποίες υπήρξε αναστολή ($P < 0.05$), σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ η σκίαση με διαβαθμίσεις υποδηλώνει δοσοεξαρτώμενη σχέση. Οι τιμές είναι μ. όροι.±s.d τριών προσδιορισμών

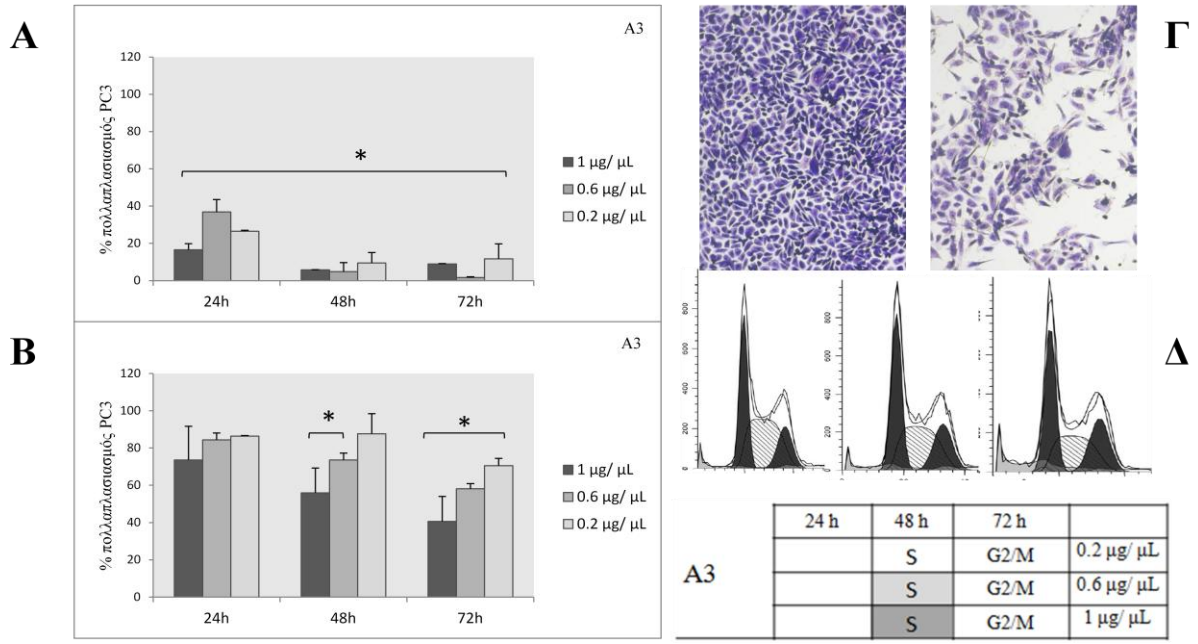
Το αφέψημα της Αντωναΐδας ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων με δοσο- και χρόνο-εξαρτώμενο τρόπο (Εικόνα 3.4Α και 3.4Β). Η αναστολή υπολογίστηκε > 90 %, όταν

αξιολογήθηκε μέσω της μιτοχονδριακής λειτουργίας των κυττάρων που είχε επιδράσει το αφέψημα (1 μg/μL), ενώ περί το 50 % όταν εκτιμήθηκε ο αριθμός των κυττάρων της καλλιέργειας. Ενδεχομένως, το αφέψημα επέδρασε αρνητικά στη λειτουργία των μιτοχονδρίων των καρκινικών κυττάρων. Η στατιστικά σημαντική αρνητική επίδραση του αφεψήματος στην ανάπτυξη, ύστερα από 48 h επώασης, φάνηκε να είναι αποτέλεσμα αναστολής του κυτταρικού κύκλου στη φάση S με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Η εκατοστιαία αύξηση του πληθυσμού των κυττάρων στη φάση αντιγραφής του κυτταρικού κύκλου εν συγκρίσει με τον αρνητικό μάρτυρα υπολογίσθηκε 21, 27 και 39 % στις συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL, αντίστοιχα. Ο κυτταρικός κύκλος των PC3 φάνηκε να αναστέλλεται στη φάση G2/M ύστερα από 72 h επώασης με το αφέψημα, παρουσιάζοντας επίσης δοσοεξαρτώμενη σχέση. Η ποσοστιαία αύξηση της φάσης G2/M ήταν 21, 39 και 74 % στις συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL, αντίστοιχα. Η επώαση με συγκέντρωση 0.2 μg/μL για 72 h δεν ανέστειλε την ανάπτυξη των κυττάρων παρά την παρουσία στατιστικά σημαντικής τροποποίησης στην κατανομή των κυττάρων στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου.



Εικόνα 3.5 Επίδραση αφεψήματος Δενδρολίβανου στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των PC3. (A) Αξιολόγηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, (B) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Crystal Violet. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δε χορηγήθηκε το αφέψημα και θεωρήθηκαν ότι είχαν 100% πολλαπλασιασμό, και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα, για 24, 48 και 72 h, σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL. (Γ) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Giemsa παρουσία (1 μg/μL) (δεξιά) και απουσία (αριστερά) του αφεψήματος, t=72 h, (Δ) Επίδραση του αφεψήματος στον κυτταρικό κύκλο (1 μg/μL), στον πίνακα σημειώνονται οι φάσεις του κύκλου στις οποίες υπήρξε αναστολή ($P < 0.05$), σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ η σκίαση με διαβαθμίσεις υποδηλώνει δοσοεξαρτώμενη σχέση. Οι τιμές είναι μ. όροι.±s.d τριών προσδιορισμών

Η καλλιέργεια των PC3 παρουσία του αφεψήματος Δενδρολίβανου οδήγησε σε αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Εικόνα 3.5Α και 3.5Β). Η αναστολή υπολογίστηκε > 90 %, όταν αξιολογήθηκε η μιτοχονδριακή λειτουργία των κυττάρων που είχε επιδράσει το αφέψημα (1 μg/μL) ύστερα από 48 h, ενώ δε σημειώθηκε μεταβολή του αριθμού των κυττάρων της καλλιέργειας. Παρόμοια με το αφέψημα της Αντωναΐδας, ενδεχομένως το αφέψημα Δενδρολίβανου επέδρασε αρνητικά στη λειτουργία των μιτοχονδρίων των καρκινικών κυττάρων. Η αναστολή της τάξης του 50 % που σημειώθηκε ύστερα από 72 h επώασης με το αφέψημα (1 μg/μL) στον αριθμό των κυττάρων ήταν αποτέλεσμα της αναχαίτισης των κυττάρων στη φάση G2/M του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα, το ποσοστό των κυττάρων που βρέθηκε στη φάση G2/M παρουσία του αφεψήματος Δενδρολίβανου σημείωσε αύξηση 21% σε σύγκριση με το αντίστοιχο ποσοστό της καλλιέργειας απουσία αφεψήμητος (21 % απουσία παράγοντα έναντι 26 % παρουσία αφεψήματος). Ο κυτταρικός κύκλος των PC3, φάνηκε να αναστέλλεται στη φάση G0/G1 ύστερα από 72 h επώασης με το αφέψημα στις συγκεντρώσεις 0.2 και 0.6 μg/μL. Ειδικότερα, σημειώθηκε αύξηση του ποσοστού των κυττάρων παρουσία αφεψήματος στη φάση G0/G1, κατά 7 και 11 %, αντίστοιχα, σημειώνοντας ταυτόχρονα στατιστικά σημαντική μείωση στη φάση S, κατά 13 και 27 %, αντίστοιχα.

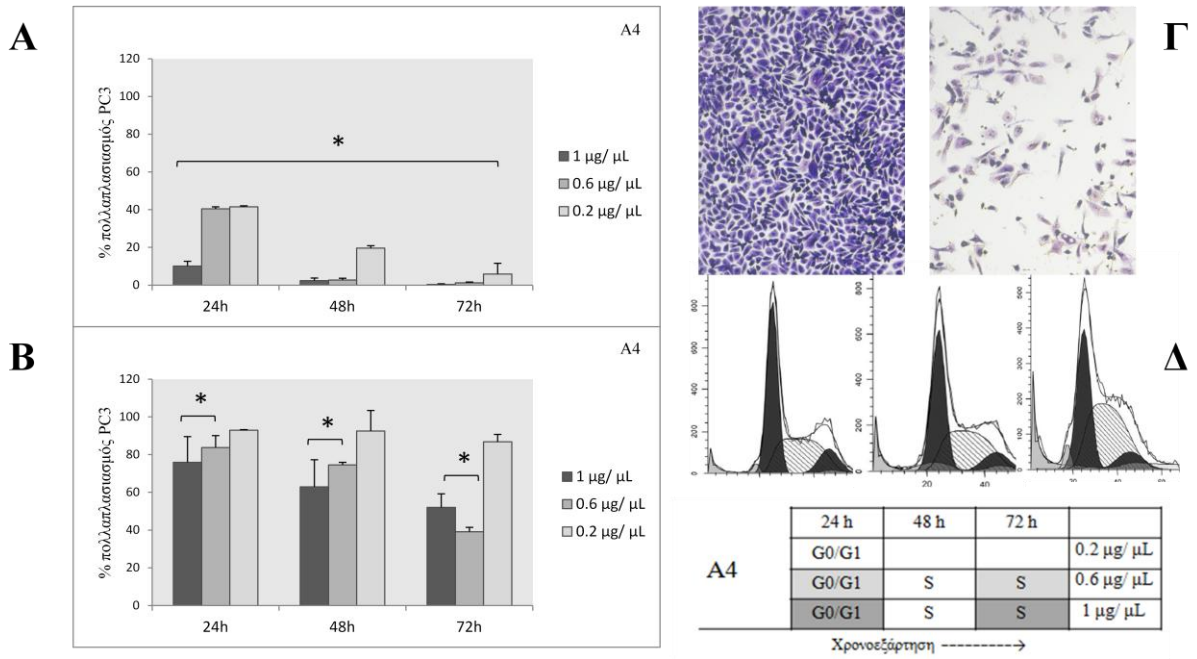


Εικόνα 3.6 Επίδραση αφεψήματος Δίκταμου στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των PC3. (Α) Αξιολόγηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, (Β) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Crystal Violet. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δε χορηγήθηκε το αφέψημα και θεωρήθηκαν ότι είχαν 100% πολλαπλασιασμό, και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα, για 24, 48 και 72 h, σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL. (Γ) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Giemsa παρουσία (1 μg/μL) (δεξιά) και απουσία (αριστερά) του αφεψήματος, t=72 h, (Δ) Επίδραση του αφεψήματος στον κυτταρικό κύκλο (1 μg/μL), στον πίνακα σημειώνονται οι φάσεις του κύκλου στις οποίες υπήρξε αναστολή ($P < 0.05$), σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ η σκίαση με διαβαθμίσεις υποδηλώνει δοσοεξαρτώμενη σχέση. Οι τιμές είναι μ. όροι.±s.d τριών προσδιορισμών

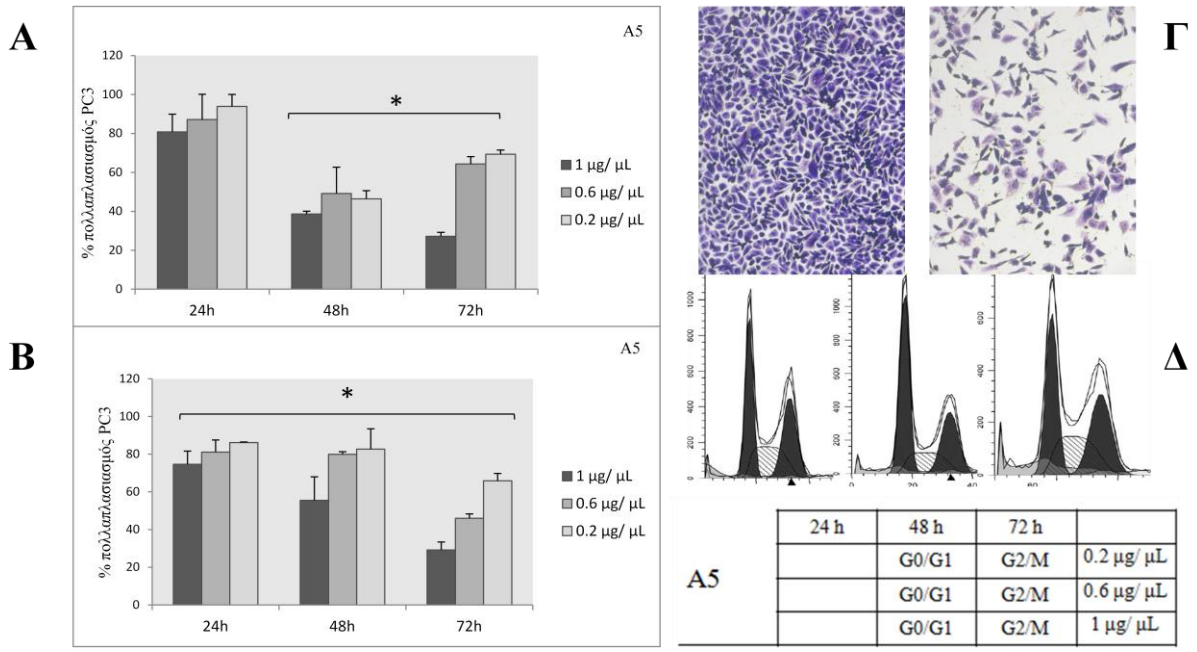
Το αφέψημα Δίκταμου ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων με δοσο- και χρόνο-εξαρτώμενο τρόπο (Εικόνα 3.6Α και 3.6Β). Η εκτιμώμενη αναστολή με χρήση της μεθόδου MTT σημειώθηκε > 60 %, σε όλες τις συγκεντρώσεις και χρόνους επώασης, ενώ το ίδιο φαινόμενο με χρώση των κυττάρων εκτιμήθηκε έως 60 %, μόνο ύστερα από επώαση 72 h με 1 μg/μL αφεψήματος. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί επίσης στην υπόθεση ότι, το αφέψημα Δίκταμου επέδρασε αρνητικά στη λειτουργία των μιτοχονδρίων των καρκινικών κυττάρων. Η στατιστικά σημαντική αναστολή του πολλαπλασιασμού με δοσοεξαρτώμενο τρόπο που σημειώθηκε ύστερα από 48 h επώασης με το αφέψημα επαληθεύεται από το πείραμα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα, το αφέψημα ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μέσω αναστολής στη φάση S, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να συσσωρεύονται στη φάση αυτή ύστερα από 48 h επώασης. Το ποσοστό των κυττάρων που καταγράφηκε στη φάση αντιγραφής ήταν 26 % απουσία αφεψήματος, ενώ παρουσία του 30, 35, και 42 % για τις συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL, αντίστοιχα. Τα προαναφερθέντα ποσοστά ερμηνεύονται ως αύξηση της συσσώρευσης των κυττάρων στη φάση S κατά 19, 38 και 62 %, αντίστοιχα. Συνεχίζοντας, η αύξηση της έντασης του φαινομένου που καταγράφεται ύστερα από 72 h επώασης φάνηκε να σχετίζεται με συσσώρευση των κυττάρων στη φάση G2/M. Η αναστολή στη φάση G2/M επαληθεύεται στατιστικά για όλες συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν, ωστόσο δεν παρατηρήθηκε σχέση δοσοεξάρτησης. Τα ποσοστά αύξησης που καταγράφηκαν στη φάση αυτή ήταν 22, 63, και 23 % για τις συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL, αντίστοιχα.

Το αφέψημα Θρύμπας ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων με δοσο- και χρόνο-εξαρτώμενο τρόπο, όπως επαληθεύεται από το σύνολο των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν (Εικόνα 3.7). Από την παρατήρηση της εικόνας της καλλιέργειας παρουσία του αφεψήματος (Εικόνα 3.7Γ) φαίνεται ότι η αναστολή που σημειώθηκε ήταν > 50 % (ύστερα από 72 h επώασης). Επίσης η αναστολή του πολλαπλασιασμού από το αφέψημα Θρύμπας υπερεκτιμήθηκε μέσω ελέγχου της μιτοχονδριακής λειτουργίας, καθώς με χρήση της μεθόδου MTT σημειώθηκε αναστολή έως και 95 % για τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν ύστερα από 72 h επώασης των κυττάρων παρουσία του αφεψήματος. Η στατιστικά σημαντική αναστολή του πολλαπλασιασμού που σημειώθηκε ύστερα από 24 h επώασης με το αφέψημα ήταν αποτέλεσμα της αναχαίτισης των κυττάρων στη φάση G0/G1 του κύκλου. Το ποσοστό των κυττάρων που καταγράφηκε στη φάση ηρεμίας ήταν 33 % απουσία αφεψήματος, ενώ παρουσία του 38, 44, και 47 % για τις συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL, αντίστοιχα. Τα προαναφερθέντα ποσοστά ερμηνεύονται ως αύξηση της συσσώρευσης των κυττάρων στη φάση G0/G1 κατά 15, 35 και 42 %, αντίστοιχα. Η εξέλιξη της αναστολής ύστερα από 48 και 72 h επώασης με το αφέψημα ήταν

αποτέλεσμα της συσσώρευσης των κυττάρων στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Ειδικότερα, επώαση των κυττάρων PC3 με το αφέψημα Θρύμπας για 48 h οδήγησε σε αύξηση του ποσοστού των κυττάρων στη φάση αντιγραφής (κατά 22 και 9 % για τις συγκεντρώσεις 0.6 και 1 μg/μL, αντίστοιχα) μειώνοντας ταυτόχρονα το ποσοστό των κυττάρων στη φάση G2/M (καταγεγραμμένα ποσοστά: αρνητικός μάρτυρας 19 %, 0.6 μg/μL 7 % και 1 μg/μL 11 %). Η αναχαίτιση των κυττάρων στη φάση αντιγραφής παρουσίασε σχέση χρονοεξάρτησης ύστερα από 72 h επώασης, καθώς το ποσοστό των κυττάρων που εντοπίστηκαν στη φάση αυτή παρουσία αφεψήματος ήταν 51 και 52 % για τις συγκεντρώσεις 0.6 και 1 μg/μL, αντίστοιχα, έναντι 31 % που καταγράφηκε στο πληθυσμό των κυττάρων απουσία αφεψήματος. Τα προανεφερθένα ποσοστά ερμηνεύονται ως αύξηση της συσσώρευσης των κυττάρων στη φάση S κατά 63 και 66 %, αντίστοιχα, ενώ ταυτόχρονη μείωση του ποσοστού των κυττάρων παρατηρήθηκε στις φάσεις G0/G1 και G2/M.

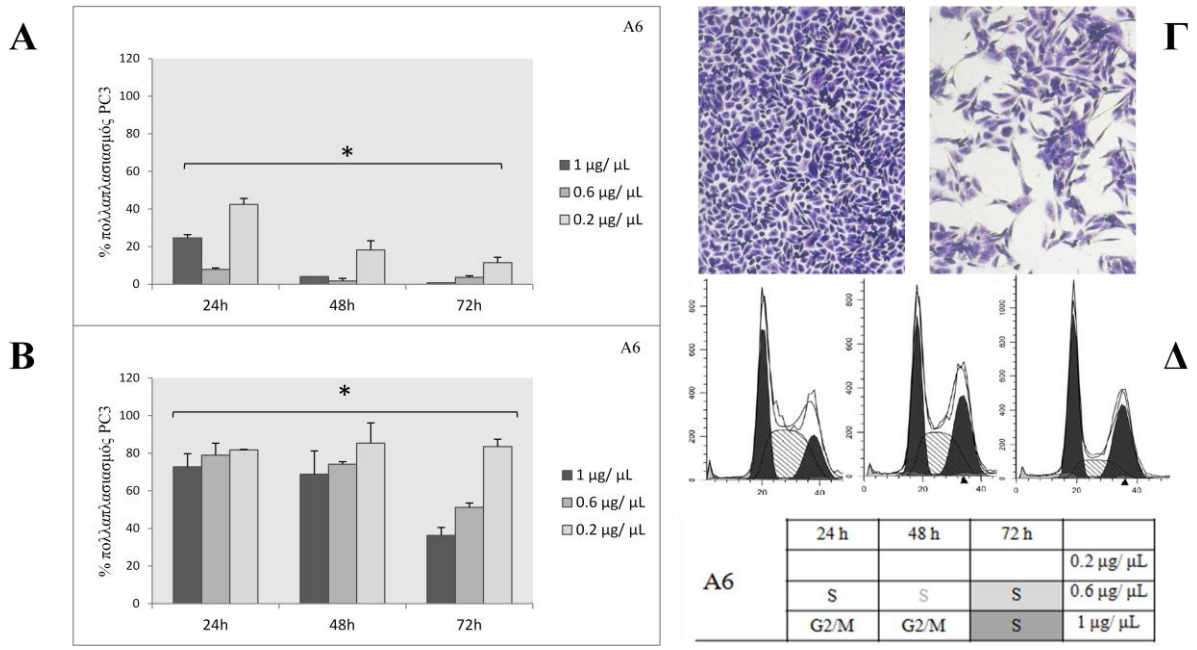


Εικόνα 3.7 Επίδραση αφεψήματος Θρύμπας στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των PC3. (A) Αξιολόγηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, (B) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Crystal Violet. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δε χορηγήθηκε το αφέψημα και θεωρήθηκαν ότι είχαν 100% πολλαπλασιασμό, και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα, για 24, 48 και 72 h, σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL. (Γ) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Giemsa παρουσία (1 μg/μL) (δεξιά) και απουσία (αριστερά) του αφεψήματος, t=72 h, (Δ) Επίδραση του αφεψήματος στον κυτταρικό κύκλο (1 μg/μL), στον πίνακα σημειώνονται οι φάσεις του κύκλου στις οποίες υπήρξε αναστολή ($P < 0.05$), σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ η σκίαση με διαβαθμίσεις υποδηλώνει δοσοεξαρτώμενη σχέση. Οι τιμές είναι μ. όροι.±s.d τριών προσδιορισμών



Εικόνα 3.8 Επίδραση αφεψήματος Θυμαριού στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των PC3. (Α) Αξιολόγηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, (Β) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Crystal Violet. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δε χορηγήθηκε το αφέψημα και θεωρήθηκαν ότι είχαν 100% πολλαπλασιασμό, και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα, για 24, 48 και 72 h, σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL. (Γ) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Giemsa παρουσία (1 μg/μL) (δεξιά) και απουσία (αριστερά) του αφεψήματος, t=72 h, (Δ) Επίδραση του αφεψήματος στον κυτταρικό κύκλο (1 μg/μL), στον πίνακα σημειώνονται οι φάσεις του κύκλου στις οποίες υπήρξε αναστολή ($P < 0.05$), σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ η σκίαση με διαβαθμίσεις υποδηλώνει δοσοεξαρτώμενη σχέση. Οι τιμές είναι μ. όροι.±s.d τριών προσδιορισμών

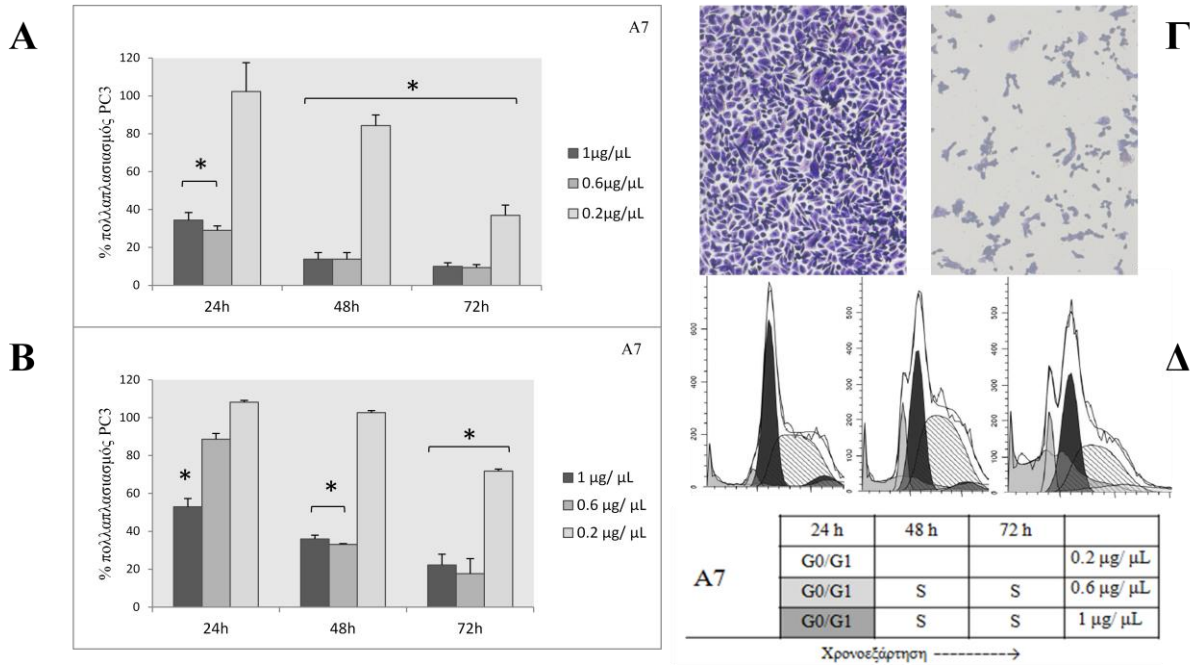
Το αφέψημα Θυμαριού ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων με δοσο- και χρόνο-εξαρτώμενο τρόπο (Εικόνα 3.8). Η αναστολή του πολλαπλασιασμού που σημειώθηκε από το αφέψημα με χρήση της μεθόδου MTT (Εικόνα 3.8Α) και με σήμανση των ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Crystal Violet (Εικόνα 3.8Β) σε γενικές γραμμές δεν παρουσίασε σημαντικές αποκλίσεις. Η αναστολή που σημειώθηκε ύστερα από 48 h επώασης ήταν περί το 50 % και φάνηκε να είναι αποτέλεσμα συσσώρευσης των κυττάρων στη φάση G0/G1. Ειδικότερα, η παρουσία του αφεψήματος από Θυμάρι οδήγησε σε αύξηση της συσσώρευσης των κυττάρων στη φάση ηρεμίας κατά 13, 15 και 11 % για τις συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL, αντίστοιχα, ενώ σημειώθηκε ταυτόχρονη μείωση του ποσοστού των κυττάρων στις φάσεις S και G2/M. Η αναστολή του πολλαπλασιασμού σημειώνεται εντονότερη ύστερα από 72 h επώασης σε όλες τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν και κυμάνθηκε μεταξύ 32 και 65 %. Η αυξημένη αναστολή του πολλαπλασιασμού που προκλήθηκε στις 72 h στα PC3 παρουσία αφεψήματος Θυμαριού ήταν αποτέλεσμα της συσσώρευσης των κυττάρων στη φάση G2/M του κυτταρικού κύκλου, ωστόσο δεν επιβεβαιώθηκε Η σχέση δοσοεξάρτησης. Τα ποσοστά αύξηση που σημειώθηκαν ήταν 32, 74 και 52 % για τις συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL, αντίστοιχα.



Εικόνα 3.9 Επίδραση αφεψήματος Μαντζουράνας στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των PC3. (Α) Αξιολόγηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, (Β) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Crystal Violet. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δε χορηγήθηκε το αφέψημα και θεωρήθηκαν ότι είχαν 100% πολλαπλασιασμό, και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα, για 24, 48 και 72 h, σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL. (Γ) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Giemsa παρουσία (1 μg/μL) (δεξιά) και απουσία (αριστερά) του αφεψήματος, t=72 h, (Δ) Επίδραση του αφεψήματος στον κυτταρικό κύκλο (1 μg/μL), στον πίνακα σημειώνονται οι φάσεις του κύκλου στις οποίες υπήρξε αναστολή ($P < 0.05$), σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ η σκίαση με διαβαθμίσεις υποδηλώνει δοσοεξαρτώμενη σχέση. Οι τιμές είναι μ. όροι.±s.d τριών προσδιορισμών

Το αφέψημα Μαντζουράνας επίσης ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων με δοσο- και χρόνο-εξαρτώμενο τρόπο (Εικόνα 3.9Α και 3.9Β). Η εκτιμώμενη αναστολή με χρήση της μεθόδου MTT σημειώθηκε > 55 %, σε όλες τις συγκεντρώσεις και χρόνους επώασης. Αντίθετα, η αναστολή κατέγραψε τιμές περί το 30 % ύστερα από επώαση 24 και 48 h με 1 μg/μL αφεψήματος και περί το 60 % ύστερα από επώαση 72 h με την ίδια συγκέντρωση. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί επίσης στην υπόθεση ότι, το αφέψημα Μαντζουράνας επέδρασε αρνητικά στη λειτουργία των μιτοχονδρίων των καρκινικών κυττάρων. Η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των PC3 παρουσία του αφεψήματος στη συγκέντρωση 1 μg/μL ήταν αποτέλεσμα αναχαίτισης των κυττάρων στη φάση G2/M. Συγκεκριμένα, η παρουσία του αφεψήματος ανέστειλε τη μιτωτική διαδικασία, αναχαιτίζοντας τα καρκινικά κύτταρα στη φάση G2/M, το ποσοστό των οποίων στη φάση αυτή ήταν σχεδόν το διπλάσιο του αντίστοιχου της καλλιέργειας απουσία αφεψήματος (από 19 % σε 37 %). Η αναστολή στη φάση G2/M διατηρήθηκε ύστερα από 48 h επώασης με το αφέψημα, χωρίς ωστόσο να παρατηρηθεί σχέση χρονοεξάρτησης (αύξηση του ποσοστού κατά 56 %). Η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των PC3 παρουσία του αφεψήματος στη συγκέντρωση 0.6 μg/μL σε όλους τους χρόνους επώασης, και στη συγκέντρωση 1 μg/μL, έπειτα από 72 h επώασης, ήταν

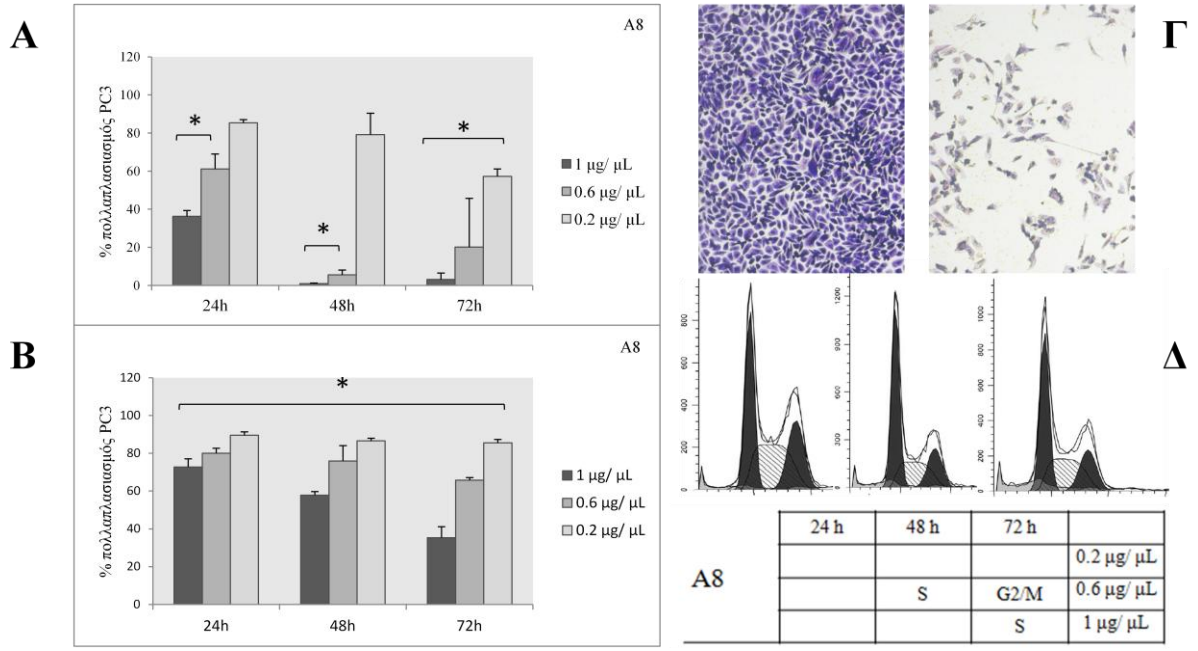
αποτέλεσμα αναχαίτισης των κυττάρων στη φάση S. Η συσσώρευση των κυττάρων στη φάση αντιγραφής αν και δε φάνηκε να εξελίσσεται θετικά με το χρόνο, ωστόσο φάνηκε να παρουσίαζει δοσοεξαρτώμενη σχέση. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αύξηση 69 % και 84 % ύστερα από επώαση με το αφέψημα Μαντζουράνας σε συγκεντρώσεις 0.6 και 1 μg/μL, αντίστοιχα (καταγεγραμμένα ποσοστά: αρνητικός μάρτυρας 31 %, 0.6 μg/μL 53 % και 1 μg/μL 59 %).



Εικόνα 3.10 Επίδραση αφεψήματος Μελισσόχορτου στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των PC3. (Α) Αξιολόγηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, (Β) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Crystal Violet. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δε χορηγήθηκε το αφέψημα και θεωρήθηκαν ότι είχαν 100% πολλαπλασιασμό, και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα, για 24, 48 και 72 h, σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL. (Γ) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Giemsa παρουσία (1 μg/μL) (δεξιά) και απουσία (αριστερά) του αφεψήματος, t=72 h, (Δ) Επίδραση του αφεψήματος στον κυτταρικό κύκλο (1 μg/μL), στον πίνακα σημειώνονται οι φάσεις του κύκλου στις οποίες υπήρξε αναστολή ($P < 0.05$), σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ η σκίαση με διαβαθμίσεις υποδηλώνει δοσοεξαρτώμενη σχέση. Οι τιμές είναι μ. όροι.±s.d τριών προσδιορισμών

Το αφέψημα Μελισσόχορτου ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Από την παρατήρηση της εικόνας της καλλιέργειας παρουσία του αφεψήματος (Εικόνα 3.10Γ) φαίνεται ότι η αναστολή που σημειώθηκε ήταν> 80 % (ύστερα από 72 h επώασης), γεγονός που επαληθεύεται από τη συνολική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Το αφέψημα προκάλεσε επίσης μεταβολή της λειτουργίας των μιτοχονδρίων, όπως επαληθεύεται από τις διαφορές που παρατηρήθηκαν μεταξύ των μεθόδων (Εικόνα 3.10Α και 3.10Β). Η αναστολή του πολλαπλασιασμού που καταγράφηκε ύστερα από 24 h επώασης με το αφέψημα φαίνεται εν μέρει να είναι αποτέλεσμα της αναχαίτισης των κυττάρων στη φάση G0/G1 του κύκλου με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Συγκεκριμένα, στο σύνολο των συγκεντρώσεων που εξετάσθηκαν

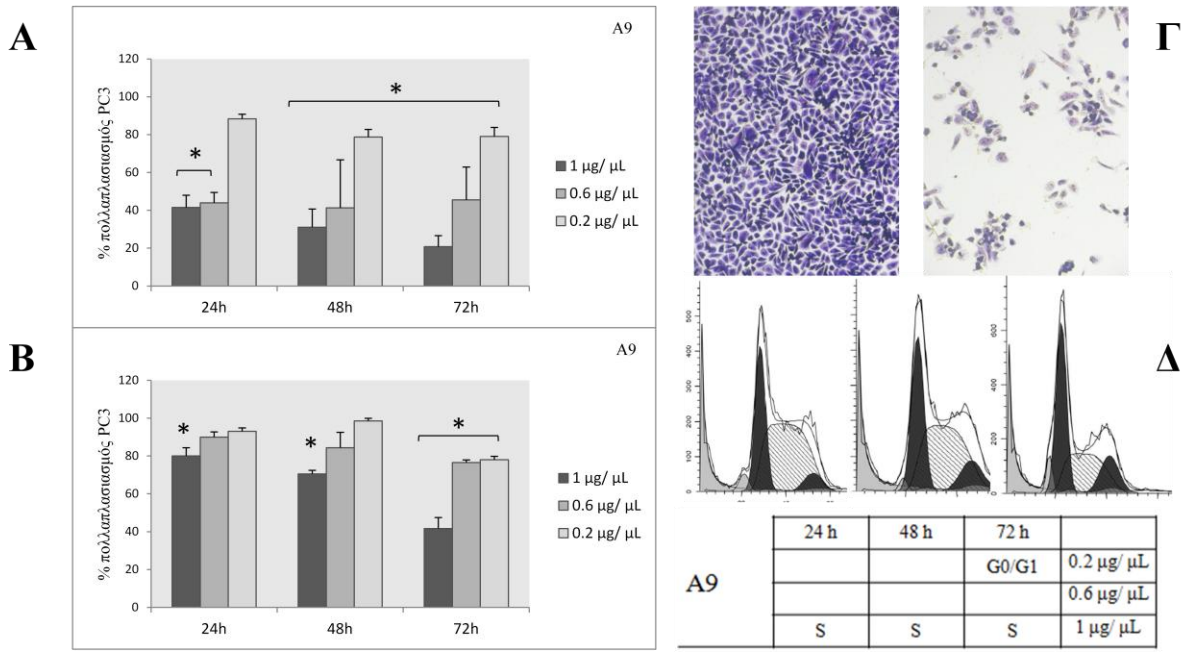
(ακόμα και στη συγκέντρωση 0.2 μg/μL, όπου δεν παρατηρήθηκε μείωση των κυττάρων της καλλιέργειας) καταγράφηκε στατιστικά σημαντική αναστολή της εισόδου των κυττάρων στη φάση αντιγραφής. Τα αντίστοιχα ποσοστά αύξηση της φάσης G0/G1 στις συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL ήταν 22, 27 και 31 %. Αναφέρεται επίσης η σημαντική μείωση που σημειώθηκε στο ποσοστό των κυττάρων στη φάση G2/M παρουσία του αφεψήματος (καταγεγραμμένα ποσοστά: αρνητικός μάρτυρας 19 %, 0.2 μg/μL 5 %, 0.6 μg/μL 3 % και 1 μg/μL 6 %). Η εξέλιξη της αναστολής ύστερα από 48 και 72 h επώασης με το αφέψημα ήταν αποτέλεσμα της συσσώρευσης των κυττάρων στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Η αναστολή στη φάση αυτή δεν ήταν δοσοεξαρτώμενη κάθως το φαινόμενο σταθεροποιήθηκε ήδη από τη συγκέντρωση 0.6 μg/μL. Η αύξηση που σημειώθηκε ύστερα από 48 h επώασης ήταν περίπου 40 %. Η αναστολή στη φάση S είχε θετική συσχέτιση με το χρόνο επώασης, καθώς η παρουσία του αφεψήματος στην καλλιέργεια για 72 h προκάλεσε αύξηση του ποσοστού των κυττάρων στη φάση αυτή περίπου 90 %.



Εικόνα 3.11 Επίδραση αφεψήματος Ρίγανης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των PC3. (Α) Αξιολόγηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, (Β) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Crystal Violet. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δε χορηγήθηκε το αφέψημα και θεωρήθηκαν ότι είχαν 100% πολλαπλασιασμό, και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα, για 24, 48 και 72 h, σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL. (Γ) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Giemsa παρουσία (1 μg/μL) (δεξιά) και απουσία (αριστερά) του αφεψήματος, t=72 h, (Δ) Επίδραση του αφεψήματος στον κυτταρικό κύκλο (1 μg/μL), στον πίνακα σημειώνονται οι φάσεις του κύκλου στις οποίες υπήρξε αναστολή ($P < 0.05$), σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ η σκίαση με διαβαθμίσεις υποδηλώνει δοσοεξαρτώμενη σχέση. Οι τιμές είναι μ. όροι.±s.d τριών προσδιορισμών

Το αφέψημα Ρίγανης ανέστειλε επίσης τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων PC3 (Εικόνα 3.11). Η σχέση δοσοεξάρτησης ήταν έντονα εμφανής ήδη από τις πρώτες 24 h επώασης με το

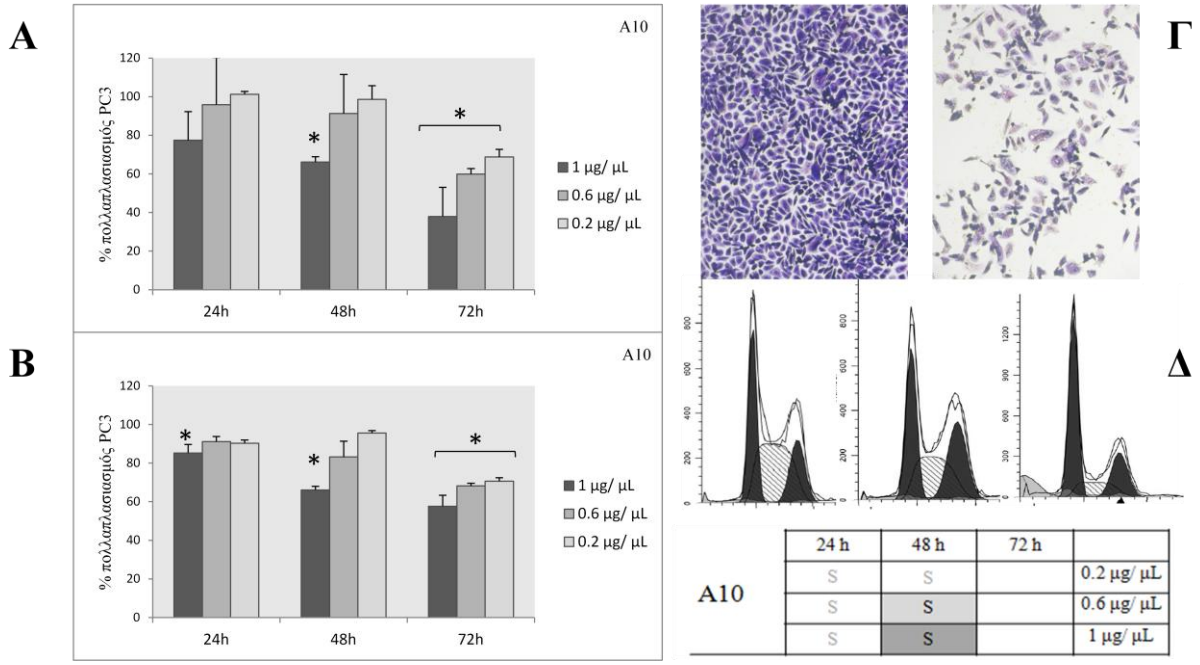
αφέψημα. Η αναστολή παρουσίασε θετική συσχέτιση με το χρόνο, ειδικότερα για τις συγκεντρώσεις 0.6 και 1 μg/μL (από 41 % σε 63 % και από 22 % σε 35 %, αντίστοιχα). Το αφέψημα προκάλεσε επίσης μεταβολή της λειτουργίας των μιτοχονδρίων, όπως επαληθεύεται από τις διαφορές που παρατηρήθηκαν μεταξύ των μεθόδων MTT και χρώση των κυττάρων (Εικόνα 3.11Α και 3.11Β). Η αναστολή που σημειώθηκε στις 48 h επώασης φάνηκε να σχετίζεται με τη συσσώρευση του πληθυσμού των κυττάρων που καταγράφηκε στη φάση S. Η αύξηση που σημειώθηκε, ύστερα από επώαση με το αφέψημα Ρίγανης σε συγκεντρώσεις 0.6 και 1 μg/μL, ήταν περί το 20 %, στατιστικά ωστόσο επαληθεύεται μόνο στη συγκέντρωση 0.6 μg/μL. Η αναστολή του πολλαπλασιασμού ήταν εντονότερη ύστερα από 72 h επώασης (σχέση χρονοεξάρτησης) και πιθανώς ήταν αποτέλεσμα της συσσώρευσης των κυττάρων στη φάση G2/M (παρατηρούμενη αύξηση 41 %) του κυτταρικού κύκλου και στη φάση S (παρατηρούμενη αύξηση 25 %), που σημειώθηκε για τις συγκεντρώσεις 0.6 και 1μg/μL, αντίστοιχα.



Εικόνα 3.12 Επίδραση αφεψήματος Σπαθόχορτου στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των PC3. (Α) Αξιολόγηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, (Β) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Crystal Violet. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δε χορηγήθηκε το αφέψημα και θεωρήθηκαν ότι είχαν 100% πολλαπλασιασμό, και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα, για 24, 48 και 72 h, σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL. (Γ) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Giemsa παρουσία (1 μg/μL) (δεξιά) και απουσία (αριστερά) του αφεψήματος, t=72 h, (Δ) Επίδραση του αφεψήματος στον κυτταρικό κύκλο (1 μg/μL), στον πίνακα σημειώνονται οι φάσεις του κύκλου στις οποίες υπήρξε αναστολή ($P < 0.05$), σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ η σκίαση με διαβαθμίσεις υποδηλώνει δοσοεξαρτώμενη σχέση. Οι τιμές είναι μ. όροι.±s.d τριών προσδιορισμών

Το αφέψημα Σπαθόχορτου παρουσίασε και αυτό την ικανότητα αναστολής του πολλαπλασιασμού των κυττάρων PC3 (Εικόνα 3.12). Συγκεκριμένα, η παρουσία του στην καλλιέργεια ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων με δοσο- και χρόνο-εξαρτώμενο

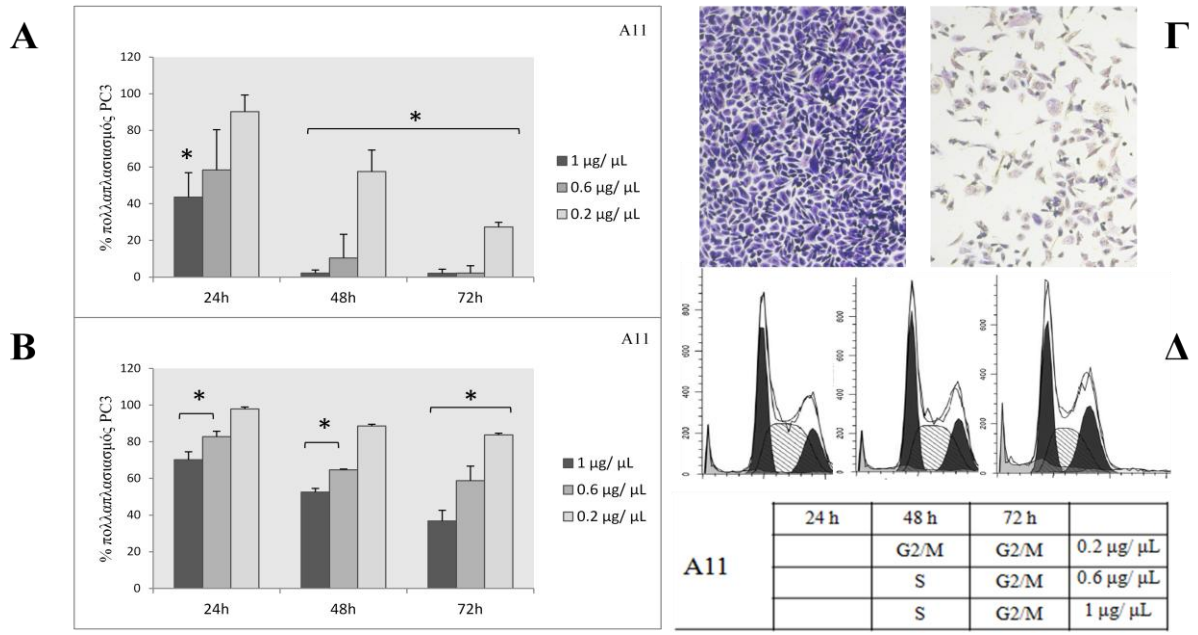
τρόπο, όπως επαληθεύεται από το σύνολο των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν. Προκαλώντας ταυτόχρονα μεταβολή στη λειτουργία των μιτοχονδρίων, το αφέψημα (1 μg/μL) περιόρισε την ικανότητα πολλαπλασιασμού κατά περίπου 20, 29 και 58 % έπειτα από χρόνους επώασης 24, 48, 72 h, αντίστοιχα. Η στατιστικά σημαντική αναστολή του πολλαπλασιασμού που σημειώθηκε για όλους τους χρόνους επώασης που μελετήθηκαν παρουσία του αφεψήματος στη συγκέντρωση 1 μg/μL, φάνηκε να σχετίζεται με τη συσσώρευση των κυττάρων στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Η επίδραση του αφεψήματος Σπαθόχορτου δεν ήταν χρονοεξαρτώμενη κάθως το φαινόμενο σταθεροποιήθηκε ήδη από τις πρώτες 24 h. Η αύξηση που σημειώθηκε ήταν περί το 20 %. Η στατιστικά σημαντική αναστολή που σημειώθηκε στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων ύστερα από επώαση 72 h στις συγκεντρώσεις 0.2 και 0.6 μg/μL ήταν περί το 20 % και φάνηκε να έιναι αποτέλεσμα αναστολής στη φάση G0/G1. Η αναστολή βρέθηκε στατιστικά σημάντική μόνο στη συγκέντρωση 0.2 μg/μL σημειώνοντας ποσοστό αύξησης επίσης περί το 20 %.



Εικόνα 3.13 Επίδραση αφεψήματος Σιδερίτη (Τσάι βουνού) στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των PC3. (A) Αξιολόγηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, (B) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Crystal Violet. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δε χορηγήθηκε το αφέψημα και θεωρήθηκαν ότι είχαν 100% πολλαπλασιασμό, και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα, για 24, 48 και 72 h, σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL. (Γ) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Giemsa παρουσία (1 μg/μL) (δεξιά) και απουσία (αριστερά) του αφεψήματος, t=72 h, (Δ) Επίδραση του αφεψήματος στον κυτταρικό κύκλο (1 μg/μL), στον πίνακα σημειώνονται οι φάσεις του κύκλου στις οποίες υπήρξε αναστολή ($P < 0.05$), σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ η σκίαση με διαβαθμίσεις υποδηλώνει δοσοεξαρτώμενη σχέση. Οι τιμές είναι μ. όροι.±s.d τριών προσδιορισμών

Το αφέψημα Σιδερίτη ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων με χρονοεξαρτώμενο τρόπο (Εικόνα 3.13). Τα αποτελέσματα των δυο μεθόδων που

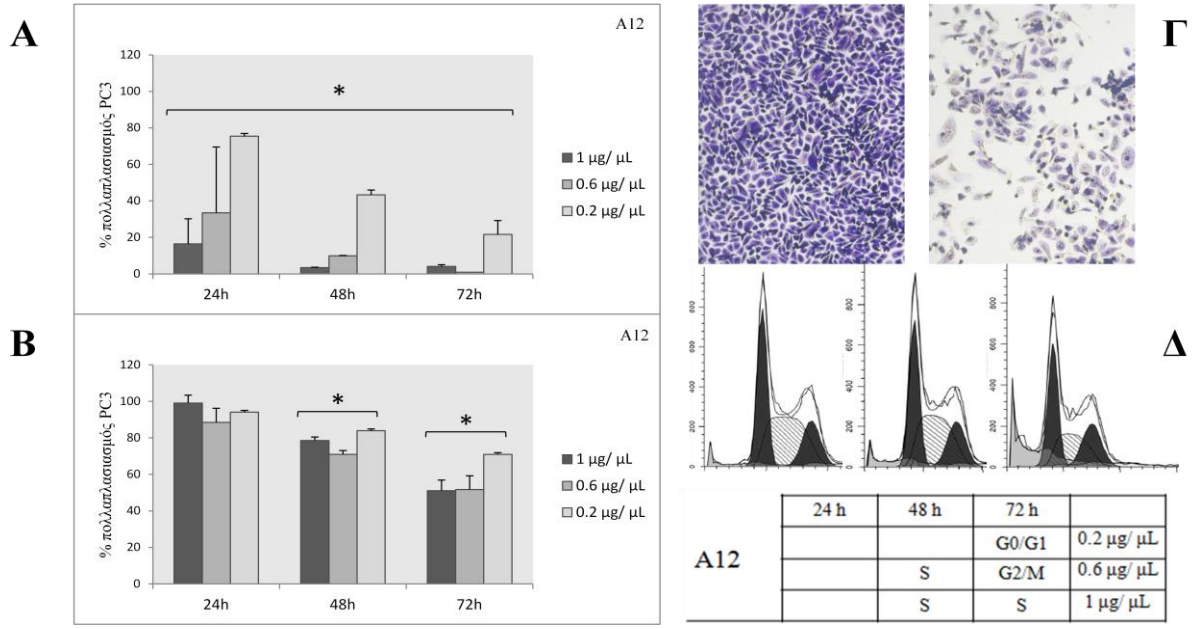
χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορίσμο της ικανότητας πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Εικόνα 3.13Α και 3.13Β) δεν παρουσίασαν σε γενικές γραμμές σημαντικές αποκλίσεις. Η επίδραση του αφεψήματος στο πολλαπλασιασμό των κυττάρων ήταν στατιστικά σημαντική μόνο στη συγκέντρωση 1 μg/μL έπειτα από 24 h επώασης και πιθανώς να είναι αποτέλεσμα συσσώρευσης των κυττάρων στη φάση αντιγραφής, χωρίς ωστόσο να επιβεβαιώνεται στατιστικά. Η αναστολή που σημειώθηκε ύστερα από 48 h επώασης ήταν περί το 17 και 28 % στις συγκεντρώσεις 0.6 και 1 μg/μL. Αν και στατιστικά σημαντική μεταβολή σημειώθηκε μόνο στη συγκέντρωση 1 μg/μL, η επίδραση ήταν αποτέλεσμα δοσοεξαρτώμενη αναστολή των κυττάρων στη φάση S. Η αντίστοιχη αύξηση του ποσοστού των κυττάρων στη φάση αυτή ήταν 18 και 27 %. Ολοκληρώνοντας, η αναστολή του πολλαπλασιασμού που παρατηρήθηκε έπειτα από 72 h επώασης σε όλες τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν δεν μπορεί να αποδοθεί σε συσσώρευση των κυττάρων σε κάποια από τις φάσεις του κύκλου καθώς καμία μεταβολή δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική. Η μέγιστη αναστολή του πολλαπλασιασμού που σημειώθηκε ύστερα από 72 h επώασης ήταν περί το 40 % (1 μg/μL).



Εικόνα 3.14 Επίδραση αφεψήματος Φασκόμηλου στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των PC3. (Α) Αξιολόγηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, (Β) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Crystal Violet. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δε χορηγήθηκε το αφέψημα και θεωρήθηκαν ότι είχαν 100% πολλαπλασιασμό, και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα, για 24, 48 και 72 h, σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL. (Γ) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Giemsa παρουσία (1 μg/μL) (δεξιά) και απουσία (αριστερά) του αφεψήματος, t=72 h, (Δ) Επίδραση του αφεψήματος στον κυτταρικό κύκλο (1 μg/μL), στον πίνακα σημειώνονται οι φάσεις του κύκλου στις οποίες υπήρξε αναστολή ($P < 0.05$), σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ η σκίαση με διαβαθμίσεις υποδηλώνει δοσοεξαρτώμενη σχέση. Οι τιμές είναι μ. όροι.±s.d τριών προσδιορισμών

Το αφέψημα Φασκόμηλου ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων με δοσο- και χρόνο-εξαρτώμενο τρόπο (Εικόνα 3.14). Η ένταση της αναστολής εκτιμάται υψηλότερη μέσω

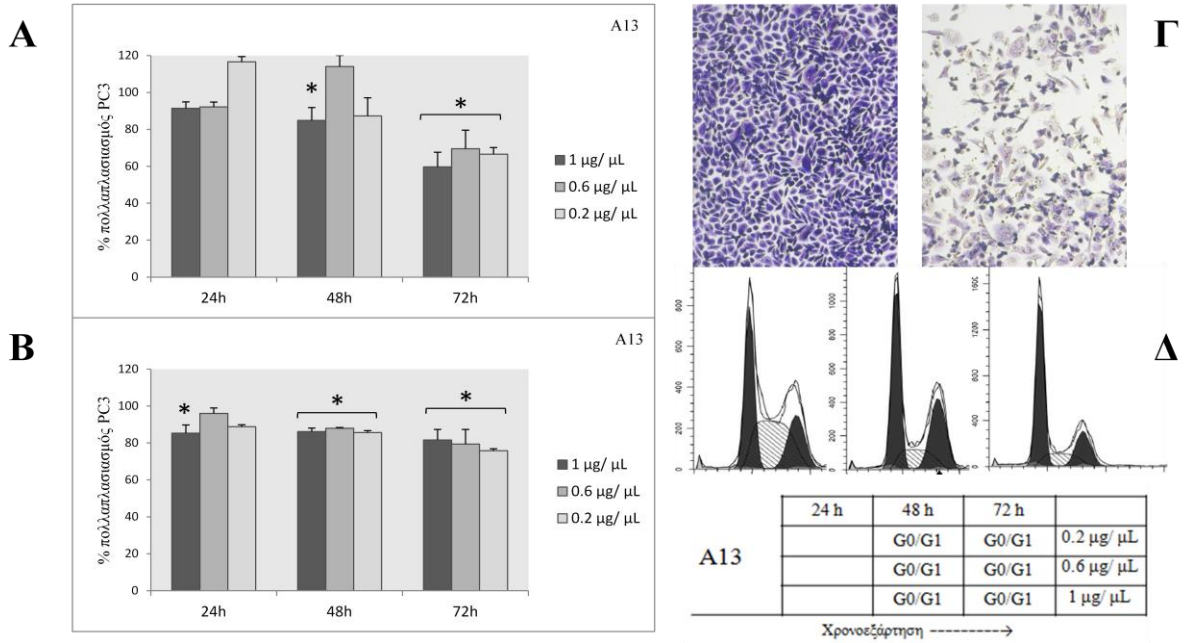
αξιολόγησης των αποτελεσμάτων που προέκυψαν με χρήση της μεθόδου MTT (Εικόνα 3.14Α). Το αφέψημα Φασκόμηλου, προκαλεί μείωση του πολλαπλασιασμού ήδη από τις πρώτες 24 h επώασης (22 % στη συγκέντρωση 1 μg/μL), ωστόσο η δράση του δεν μπόρεσε να συσχετιστεί με αναστολή των φάσεων του κυτταρικού κύκλου καθώς η κατανομή του πληθυσμού στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου παρουσία αφεψήματος δε σημείωσε στατιστικά σημαντικές αλλαγές σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα. Η αναστολή που σημειώθηκε έπειτα από 48 h επώασης με το αφέψημα (11, 35 και 47 % για τις συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL, αντίστοιχα) βρέθηκε να σχετίζεται με αναχαίτιση των κυττάρων στη φάση S του κύκλου (περί το 60 % στις συγκεντρώσεις 0.6 και 1 μg/μL αφεψήματος). Τέλος, η αναστολή του πολλαπλασιασμού έπειτα από 72 h επώασης βρέθηκε 16, 41 και 63 % για τις συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL, αντίστοιχα και πιθανώς σχετίζεται με τη συσσώρευση των κυττάρων στη φάση G2/M. Το ποσοστό των κυττάρων στη φάση αυτή ήταν διπλάσιο παρουσία 0.6 μg/μL αφεψήματος Φασκόμηλου, ενώ εκτιμήθηκε περί το 30 % για τις συγκεντρώσεις 0.2 και 1 μg/μL.



Εικόνα 3.15 Επίδραση αφεψήματος από Φλισκούνι στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των PC3. (Α) Αξιολόγηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, (Β) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Crystal Violet. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δε χορηγήθηκε το αφέψημα και θεωρήθηκαν ότι είχαν 100% πολλαπλασιασμό, και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα, για 24, 48 και 72 h, σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL. (Γ) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Giemsa παρουσία (1 μg/μL) (δεξιά) και απουσία (αριστερά) του αφεψήματος, t=72 h, (Δ) Επίδραση του αφεψήματος στον κυτταρικό κύκλο (1 μg/μL), στον πίνακα σημειώνονται οι φάσεις του κύκλου στις οποίες υπήρξε αναστολή ($P < 0.05$), σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ η σκίαση με διαβαθμίσεις υποδηλώνει δοσοεξαρτώμενη σχέση. Οι τιμές είναι μ. όροι.±s.d τριών προσδιορισμών

Το αφέψημα από Φλισκούνι ανέστειλε επίσης τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων PC3 (Εικόνα 3.15). Η αναστολή του πολλαπλασιασμού ήταν ίδια για τις συγκεντρώσεις 0.6 και 1 μg/μL, υποδεικνύοντας κορεσμό της επίδρασης του αφεψήματος στην ικανότητα

πολλαπλασιασμού των κυττάρων ήδη από τη συγκέντρωση 0.6 μg/μL. Η αναστολή ήταν στατιστικά σημαντική για όλες τις συγκεντρώσεις για 48 και 72 h επώασης. Η παρουσία του αφεψήματος από Φλισκούνι για 48 h σε PC3, προκάλεσε μέγιστη αναστολή της τάξης του 23 % και φαίνεται να σχετίζεται με την παρατηρούμενη συσσώρευση των κυττάρων στη φάση S. Η αναστολή στη φάση αυτή δεν ήταν επίσης δοσοεξαρτώμενη κάθως το φαινόμενο σταθεροποιήθηκε ήδη από τη συγκέντρωση 0.6 μg/μL (αύξηση περί το 70 %). Η αναστολή του πολλαπλασιασμού ήταν εντονότερη ύστερα από 72 h επώασης (σχέση χρονοεξάρτησης), ενώ φάνηκε ότι, η συγκέντρωση του αφεψήματος επηρεάζει τη φάση του κύκλου που καταγράφηκε η αναστολή (Εικόνα 3.15Δ). Συγκεκριμένα, η παρουσία του αφεψήματος από Φλισκούνι στις συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL προκάλεσε αύξηση 12 % του ποσοστού των κυττάρων στη φάση G0/G1, 49 % στη φάση G2/M και 22 % στη φάση S, αντίστοιχα.



Εικόνα 3.16 Επίδραση αφεψήματος από Χαμομήλι στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των PC3. (Α) Αξιολόγηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, (Β) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Crystal Violet. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δε χορηγήθηκε το αφέψημα και θεωρήθηκαν ότι είχαν 100% πολλαπλασιασμό, και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα, για 24, 48 και 72 h, σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL. (Γ) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Giemsa παρουσία (1 μg/μL) (δεξιά) και απουσία (αριστερά) του αφεψήματος, t=72 h, (Δ) Επίδραση του αφεψήματος στον κυτταρικό κύκλο (1 μg/μL), στον πίνακα σημειώνονται οι φάσεις του κύκλου στις οποίες υπήρξε αναστολή ($P < 0.05$), σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ η σκίαση με διαβαθμίσεις υποδηλώνει δοσοεξαρτώμενη σχέση. Οι τιμές είναι μ. όροι.±s.d τριών προσδιορισμών

Το αφέψημα από Χαμομήλι ανέστειλε επίσης τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων PC3 (Εικόνα 3.16). Η στατιστικά σημαντική αναστολή που καταγράφηκε για τις 48 και 72 h επώασης ήταν περί το 20 %. Η ικανότητά του να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων PC3 φάνηκε να είναι αποτέλεσμα της συσσώρευσης των κυττάρων στη φάση G0/G1 (έως 15 %). Η

παρουσία αφεψήματος Χαμομηλιού στην καλλιέργεια προκάλεσε την αύξηση του πληθυσμού των κυττάρων έως 15 % που βρίσκονταν στη φάση G0/G1, εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο τα κύτταρα να εισέλθουν στη φάση αντιγραφής. Η επίδραση του αφεψήματος ήταν χρονοεξαρτώμενη.

Μελετώντας συνολικά τα αποτελέσματα, τα αφεψήματα βοτάνων της μελέτης κατατάσσονται κατά σειρά αυξανόμενης δραστικότητας ως προς την δυνατότητα να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων PC3 ως εξής: Χαμομήλι < Δενδρολίβανο < Αντωναΐδα < Τσάι βουνού < Φλισκούνι < Θρύμπα < Ρίγανη < Φασκόμηλο < Σπαθόχορτο < Δίκταμο < Μαντζουράνα < Θυμάρι < Μελισσόχορτο.

3.3.2 Επίδραση των Αφεψημάτων στη Βιωσιμότητα και στα Επίπεδα Οξειδωτικού Στρες των Κυττάρων

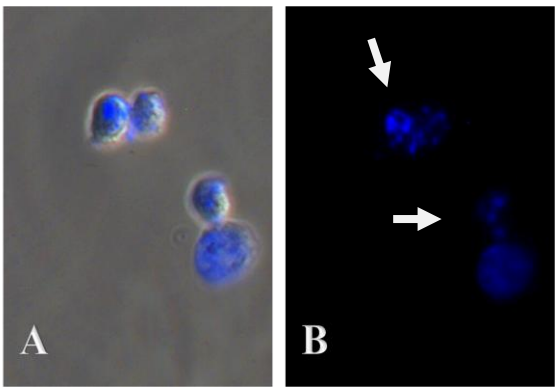
Πολλοί τύποι καρκίνου χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα δραστικών ενώσεων οξυγόνου (ROS), εν συγκρίσει με τα αντίστοιχα φυσιολογικά, κυρίως λόγω της υψηλής μεταβολικής δραστηριότητας η οποία τα διακρίνει. Οι ενδογενείς αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί των καρκινικών κυττάρων, όπως αυτοί που εμπλέκονται στη σύνθεση και αναγέννηση της GSH, είναι συνεχώς εν λειτουργία, ρυθμίζοντας τα επίπεδα οξειδωτικού στρες με αποτέλεσμα την αντίσταση στην απόπτωση, την επαγωγή της επιβίωσης και του πολλαπλασιασμού. Στη παρούσα μελέτη εξετάστηκε η ικανότητα των αφεψημάτων να επάγουν την απόπτωση καρκινικών κυττάρων και να επεμβαίνουν στην οξειδωτική κατάσταση των κυττάρων.

Η ικανότητα των αφεψημάτων να επάγουν την απόπτωση των PC3 βρέθηκε να επηρεάζεται, όπως ήταν αναμενόμενο, τόσο από το είδος και τη συγκέντρωση του βοτάνου, όσο και από το χρόνο κατά τον οποίο ήταν παρόν στην καλλιέργεια. Τα βότανα που βρέθηκαν ικανά να επάγουν την απόπτωση των κυττάρων PC3 παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.6 ($P < 0.05$). Με εξαίρεση τα αφεψήματα Αντωναΐδας, Μαντζουράνας, Ρίγανης, Σιδερίτη και Χαμομηλιού, τα υπόλοιπα μείωσαν τη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων επάγοντας την απόπτωση. Τα ποσοστά της απόπτωσης που καταγράφηκαν κυμάνθηκαν από 1.61-11.04 %. Το αφέψημα Μελισσόχορτου βρέθηκε πιο δραστικό (Εικόνα 3.17) (έως 11.04 % ύστερα από επώαση 72 h με 1 μg/μL), ενώ το αφέψημα Θρύμπας το λιγότερο δραστικό. Το αφέψημα από Φλισκούνι φάνηκε επίσης αποτελεσματικό στην επαγωγή της απόπτωσης ύστερα από 48 και 72 h παρουσίας στην καλλιέργεια, σημειώνοντας ποσοστό περί το 10 % ύστερα από επώαση 72 h με 1 μg/μL αφεψήματος. Η επίδραση των αφεψημάτων από Μελισσόχορτο και Φλισκούνι στην

βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων ήταν δοσο- και χρονο-εξαρτώμενη. Για τα υπόλοιπα αφεψήματα τα ποσοστά της απόπτωσης ήταν μεταξύ 2-5 %.

Πίνακας 3.6 Αφεψήματα βοτάνων που παρουσίασαν στατιστικά σημαντική επαγωγή της απόπτωσης ($P < 0.05$) σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα και τα αντίστοιχα ποσοστά τους στους χρόνους και τις συγκεντρώσεις επώασης με τα καρκινικά κύτταρα του προστάτη. Οι τιμές είναι μ. όροι± s.d τριών προσδιορισμών

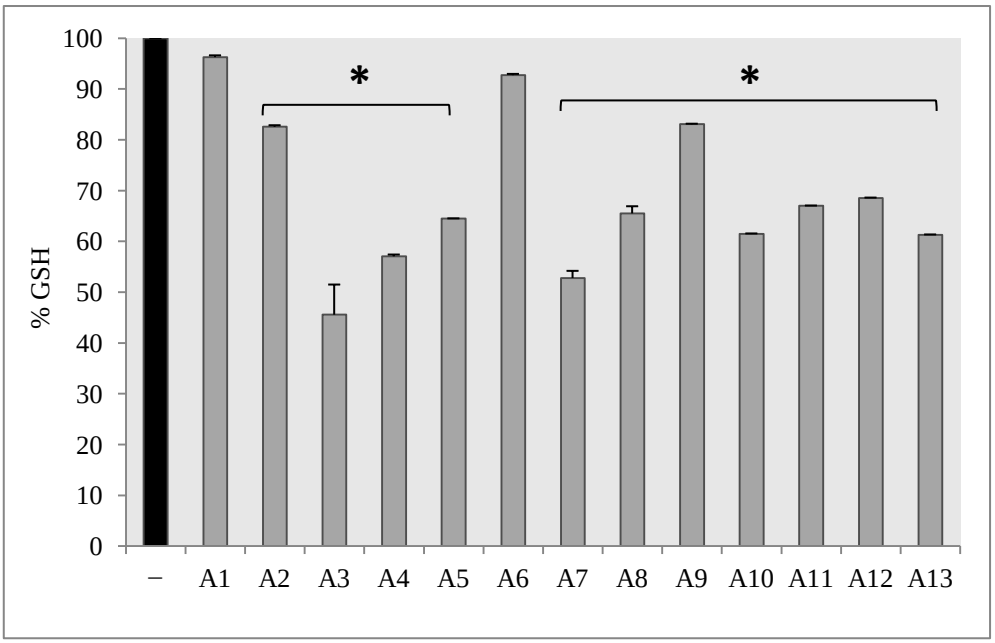
Βότανο	Συγκέντρωση (μg/μL)	Απόπτωση PC3 (%)		
		24h	48h	72h
Αρνητικός μάρτυρας	–	0.42±0.09	0.64±0.04	0.79±0.22
(A2) Δενδρολίβανο	0.2	–	–	–
	0.6	–	–	3.02 ± 0.12
	1	–	–	3.33 ± 0.05
(A3) Δίκταμο	0.2	–	–	–
	0.6	–	–	3.92 ± 0.16
	1	–	–	4.70 ± 0.25
(A4) Θρύμπα	0.2	3.83 ± 0.28	–	–
	0.6	–	1.61 ± 0.11	4.56 ± 0.52
	1	1.95 ± 0.26	–	–
(A5) Θυμάρι	0.2	–	–	–
	0.6	–	–	–
	1	–	–	3.62 ± 0.01
(A7) Μελισσόχορτο	0.2	–	–	2.70 ± 0.37
	0.6	–	–	3.13 ± 0.53
	1	3.12 ± 0.09	8.56 ± 0.92	11.04 ± 0.78
(A9) Σπαθόχορτο	0.2	3.88 ± 0.21	–	–
	0.6	–	1.85 ± 0.04	5.32 ± 0.27
	1	–	–	–
(A11) Φασκόμηλο	0.2	–	–	–
	0.6	–	–	3.54 ± 0.08
	1	–	–	4.34 ± 0.43
(A12) Φλισκούνι	0.2	–	–	–
	0.6	–	2.62 ± 0.05	4.95 ± 0.17
	1	–	3.23 ± 0.17	10.46 ± 0.31



Εικόνα 3.17 Μικροσκοπία φθορισμού των επισημασμένων με DAPI καρκινικών κυττάρων PC3.

Αποπτωτικά κύτταρα καρκίνου του προστάτη ύστερα από επίδραση με το αφέψημα Μελισσόχορτου. (A) Η φθορίζουσα ουσία δεσμεύεται στο DNA με αποτέλεσμα τη σήμανσή του. Πρόκειται για συνδυασμό (επίθεση) εικόνας φθορισμού με εικόνα αντίθεσης διαφορικής συμβολής (differential interference contrast), επιτρέποντας την ταυτόχρονη παρατήρηση των κυττάρων στο ορατό φως και του πυρήνα λόγω χρώσης με το DAPI. (B) Με χρήση φίλτρου είναι δυνατή η διάκριση των ενδονουκλεοσωμικών θραυσμάτων που σχηματίζονται ως αποτέλεσμα της κατακερμάτισης του πυρηνικού DNA κατά τη διαδικασία της απόπτωσης (λευκά βέλη)

Στο Διάγραμμα 3.10 παρουσιάζεται η επίδραση των αφεψημάτων των βοτάνων στα επίπεδα στην ενδοκυττάριας GSH των PC3. Η παρουσία των βοτάνων στην καλλιέργεια προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων της ενδοκυττάριας GSH, με εξαίρεση τα αφεψήματα Αντωναΐδας και Μαντζουράνας. Πιο δραστικά βρέθηκαν τα αφεψήματα Δίκταμου, Μελισσόχορτου και Θρύμπας προκαλώντας μείωση της GSH κατά 54 %, 47 % και 43 % αντίστοιχα. Τα αφεψήματα από Χαμομήλι, Σιδερίτη, Θυμάρι, Ρίγανη, Φασκόμηλο και Φλισκούνι προκάλεσαν μείωση η οποία που κυμάνθηκε περί το 30-35 %, ενώ τα αφεψήματα από Δενδρολίβανο και Σπαθόχορτο περί το 17 %.



*Όπου A1: Αντωναΐδα, A2: Δενδρολίβανο, A3: Δίκταμο, A4: Θρύμπα, A5: Θυμάρι, A6: Μαντζουράνα, A7: Μελισσόχορτο, A8: Ρίγανη, A9: Σπαθόχορτο, A10: Τσάι βουνού, A11: Φασκόμηλο, A12: Φλισκούνι, A13: Χαμομήλι

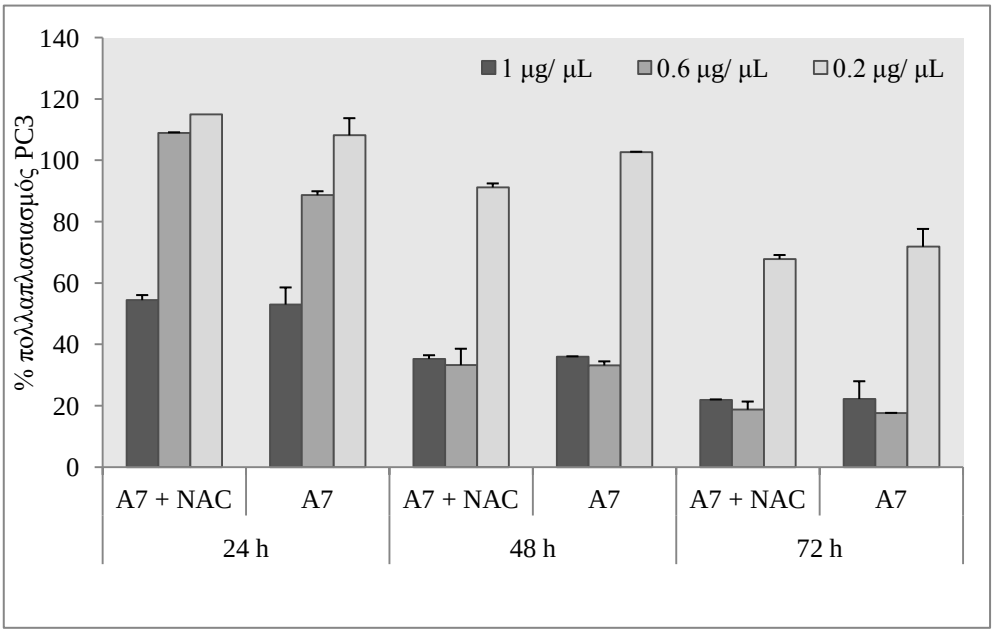
Διάγραμμα 3.10 Επίδραση των αφεψημάτων (0.2 μg/μL) στα επίπεδα της ενδοκυττάριας GSH (% μεταβολή) στα PC3 έπειτα από 24h επώασης. Ο (*) υποδηλώνει την ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς ($P < 0.05$) συγκριτικά με κύτταρα στα οποία δεν επέδρασε κανένας παράγοντας (- αρνητικός μάρτυρας) και στα οποία θεωρείται ότι τα επίπεδα της GSH ήταν 100 %. Οι τιμές είναι μ. όροι ± sd τριών προσδιορισμών

Κανένα από τα αφεψήματα των βοτάνων δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική αύξηση των ενδοκυττάριων επιπέδων των δραστικών ενώσεων οξυγόνου (Πίνακας 3.7). Επιπρόσθετα, η παρουσία NAC (N-ακετυλο-κυστεΐνης) στην καλλιέργεια, ταυτόχρονα με τα αφεψήματα δεν προκάλεσε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή στην βιωσιμότητα και τον αριθμό των κυττάρων, αφού για το σύνολο αφεψημάτων η μεταβολή κυμάνθηκε από 0 έως 5 %. Στο Διάγραμμα 3.11 παρουσιάζεται ενδεικτικά η εκατοστιαία μεταβολή του πληθυσμού των κυττάρων παρουσία αφεψήματος Μελισσόχορτου μόνο και παρουσία NAC και Μελισσόχορτου.

Πίνακας 3.7 Επίπεδα φθορισμού της ουσίας DCF εντός των κυττάρων PC3 στα οποία είχαν επιδράσει τα αφεψήματα των βοτάνων. Οι τιμές είναι μ. όροι ± sd τριών προσδιορισμών

	1 μg/μL μ. όρος±sd	0.6 μg/μL μ. όρος±sd	0.2 μg/μL μ. όρος±sd
Αρνητικός μάρτυρας	22725±609	18760±608	18087±902
A1	22733±3110	19779±1363	19217±4549
A2	21565±2938	19212±2769	21551±7074
A3	21991±1725	19616±2241	19066±4044
A4	27385±5656	22296±2928	18865±3631
A5	24441±1729	22429±4836	19652±4710
A6	22230±683	19411±2446	18041±3452
A7	22061±859	18569±541	15746±437
A8	22197±2215	23695±4451	17306±3389
A9	23480±2762	27033±6554	17658±1108
A10	23694±1495	23531±7367	16602±666
A11	23236±3043	23148±5185	16162±227
A12	20295±653	17397±610	15898±322
A13	20345±1346	16814±525	16369±769

*Όπου A1: Αντωναΐδα, A2: Δενδρολίβανο, A3: Δίκταμο, A4: Θρύμπα, A5: Θυμάρι, A6: Μαντζουράνα, A7: Μελισσόχορτο, A8: Ρίγανη, A9: Σπαθόχορτο, A10: Τσάι βουνού, A11: Φασκόμηλο, A12: Φλισκούνι, A13: Χαμομήλι



Διάγραμμα 3.11 Επίδραση του αφεψήματος Μελισσόχορτου (A7) ή του αφεψήματος Μελισσόχορτου παρουσία NAC (A7+NAC) στον πολλαπλασιασμό PC3 καρκινικών κυττάρων έπειτα από επώαση 24, 48 και 72 h σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL. Οι τιμές είναι μ. όροι ± sd τριών προσδιορισμών

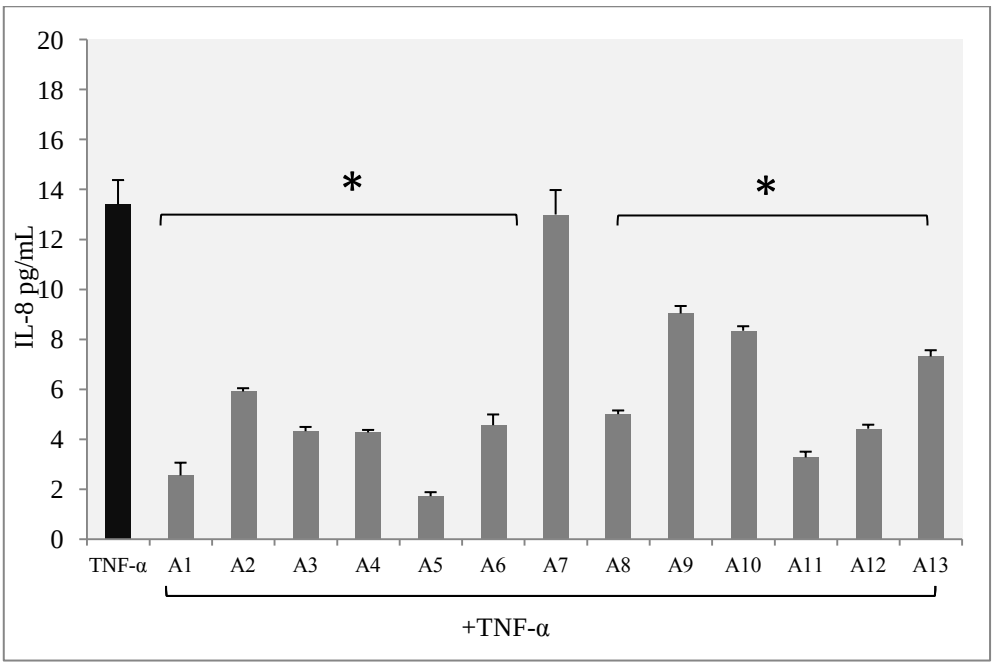
3.3.3 Επίδραση των Αφεψημάτων στα Επίπεδα Έκκρισης της Ιντερλευκίνης-8 (IL-8)

Όπως αναφέρθηκε στην Ενότητα 1.8.5 η φλεγμονώδης αντίδραση διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην εμφάνιση και εξέλιξη πολλών τύπων καρκίνου. Ο ρόλος της χημειοτακτικής πρωτεΐνης IL-8 έχει διαλευκανθεί σε καρκινικούς τύπους. Στον καρκίνο του προστάτη η έκκριση της χημειοκίνης από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα ενισχύει τον χημειοτακτισμό κυττάρων του

ανοσοποιητικού και προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση και τη μετάσταση. Στη παρούσα μελέτη εξετάστηκε η ικανότητα των αφεψημάτων να αναστέλλουν την έκκριση της IL-8 διεγερμένων με TNF-α κυττάρων PC3.

Τα επιθηλιακά κύτταρα του προστάτη εκφράζουν και εκκρίνουν την IL-8. Η προσθήκη του TNF-α, οδήγησε σε επαγωγή ενός μοντέλου φλεγμονής με αποτέλεσμα την στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων έκκρισης της χημειοκίνης (επίπεδα αρνητικού μάρτυρα: 1.3 pg/mL, επίπεδα θετικού μάρτυρα 13.4 pg/mL).

Όπως προκύπτει από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων (Διάγραμμα 3.12), το αφέψημα με τη μεγαλύτερη επίδραση στα επίπεδα έκκρισης της IL-8 των κυττάρων PC3 ήταν αυτό του Θυμαριού. Τα επίπεδα έκκρισης IL-8 διεγερμένων κυττάρων ύστερα από επώαση με το αφέψημα Θυμαριού ήταν παρόμοια με αυτά του αρνητικού μάρτυρα (περίπου 1.7 pg/mL). Η επίδραση του αφεψήματος Αντωναΐδας ήταν επίσης έντονη. Το αφέψημα ανέστειλε την έκκριση της χημειοκίνης σε ποσοστό μεγαλύτερο από 80 %. Τα αφεψήματα από Δίκταμο, Δενδρολίβανο, Θρύμπα, Μαντζουράνα, Ρίγανη και Φλισκούνι προκάλεσαν επίσης σημαντική μείωση των επιπέδων της IL-8. Τα επίπεδα της εκκρινόμενης πρωτεΐνης για τα προαναφερθέντα αφεψήματα κυμάνθηκαν μεταξύ 4.3 και 5.9 pg/mL. Η παρουσία των αφεψημάτων Σπαθόχορτου, Σιδερίτη και Χαμομηλιού στην καλλιέργεια των κυττάρων PC3 επηρέασε αρνητικά την έκκριση της IL-8, προκαλώντας μείωση περί το 60 %. Τέλος, το αφέψημα Μελισσόχορτου δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης.



*Όπου Α1: Αντωναΐδα, Α2: Δενδρολίβανο, Α3: Δίκταμο, Α4: Θρύμπα, Α5: Θυμάρι, Α6: Μαντζουράνα, Α7: Μελισσόχορτο, Α8: Ρίγανη, Α9: Σπαθόχορτο, Α10: Τσάι βουνού, Α11: Φασκόμηλο, Α12: Φλισκούνι, Α13: Χαμομήλι

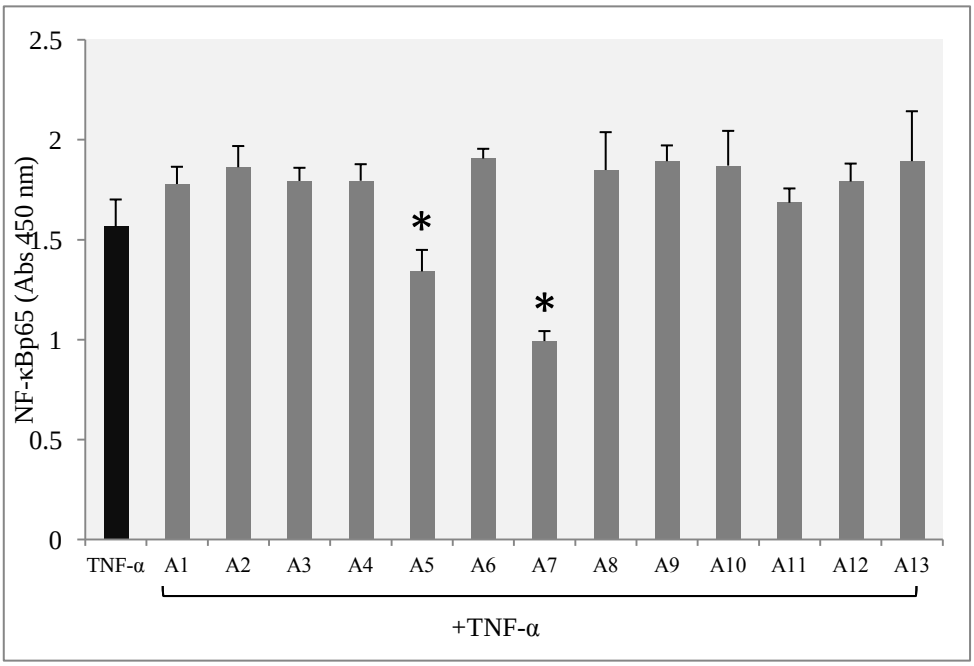
Διάγραμμα 3.12 Επίδραση των αφεψημάτων στα επίπεδα έκκρισης της IL-8 σε διεγερμένα PC3 έπειτα από επώαση 24 h επώασης. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.0001$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία είχε επιδράσει ο TNF-α (θετικός μάρτυρας) και εκείνων στα οποία είχαν επιδράσει τα αφεψήματα βοτάνων. Οι τιμές είναι μ. όροι ± sd τριών προσδιορισμών

3.3.4 Επίδραση των Αφεψημάτων στα Επίπεδα του Πυρηνικού Παράγοντα-κΒ (NF-κΒ) p65

Όπως αναφέρεται στην Ενότητα 1.8.5 ο πυρηνικός παράγοντας-κΒ αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα που ελέγχει την έκφραση πλήθους γονιδίων που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην προαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της επιβίωσης, της φλεγμονώδους διαδικασίας καθώς και στη αναστολή σηματοδοτικών μονοπατιών που οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο. Στον καρκίνο του προστάτη έχει αναφερθεί υπερέκφραση του NF-κΒ. Στη παρούσα μελέτη εξετάστηκε η ικανότητα των αφεψημάτων να αναστέλλουν τα επίπεδα του NF-κΒp65 διεγερμένων με TNF-α κυττάρων PC3.

Τα επιθηλιακά κύτταρα του προστάτη εκφράζουν τον NF-κΒ. Η προσθήκη του TNF-α, οδήγησε σε επαγωγή ενός μοντέλου φλεγμονής με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του NF-κΒ (5 φορές υψηλότερα επίπεδα ενεργοποίησης). Η θετική μεταβολή που παρατηρήθηκε στην απορρόφηση ήταν στατιστικά σημαντική ($P < 0.0001$).

Στο Διάγραμμα 3.13 φαίνεται η επίδραση των αφεψημάτων στα επίπεδα ενεργοποίησης του NF-κBp65 διεγερμένων κυττάρων PC3. Η επώαση των κυττάρων με τα αφεψήματα δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων του μεταγραφικού παράγοντα, με εξαίρεση τα αφεψήματα Μελισσόχορτου και Θυμαριού όπου σημειώθηκε μείωση της τάξης του 36 και 14 %, αντίστοιχα.



*Όπου A1: Αντωναΐδα, A2: Δενδρολίβανο, A3: Δίκταμο, A4: Θρύμπα, A5: Θυμάρι, A6: Μαντζουράνα, A7: Μελισσόχορτο, A8: Ρίγανη, A9: Σπαθόχορτο, A10: Τσάι βουνού, A11: Φασκόμηλο, A12: Φλισκούνι, A13: Χαμομήλι

Διάγραμμα 3.13 Επίδραση αφεψημάτων στα επίπεδα ενεργοποίησης του NF-κBp65 σε διεγερμένα PC3 έπειτα από επώαση 24 h. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.0001$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία είχε επιδράσει ο TNF-α (θετικός μάρτυρας) και εκείνων στα οποία είχαν επιδράσει τα αφεψήματα βοτάνων. Οι τιμές είναι μ. όροι ± sd τριών προσδιορισμών

3.3.5 Συσχέτιση Χημειοπροστατευτικής Δράσης των Αφεψημάτων στα PC3 με το Φαινολικό τους Περιεχόμενο

Η ικανότητα των αφεψημάτων να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του προστάτη συσχετίσθηκε με την παρουσία των υδροξυ-κινναμωμικών οξέων (R=0.565, $P < 0.05$), και συγκεκριμένα με το ροσμαρινικό (R=0.599, $P < 0.05$) και το καφεϊκό οξύ (R=0.592, $P < 0.05$) καθώς και με τα τερπενικά οξέα (R=0.592, $P < 0.05$). Η αναστολή στα επίπεδα έκκρισης της χημειοκίνης IL-8 δε συσχετίσθηκε με κανένα από τα φυτοχημικά συστατικά των αφεψημάτων. Η αντιφλεγμονώδης δράσης που καταγράφηκε μέσω μείωσης των επιπέδων ενεργοποίησης του NF-κB συσχετίσθηκε με τα υδροξυ-κινναμωμικά οξέα, παρουσιάζοντας βαθμό συσχέτισης R=0.886 ($P < 0.001$) και ειδικότερα, με το 3-4

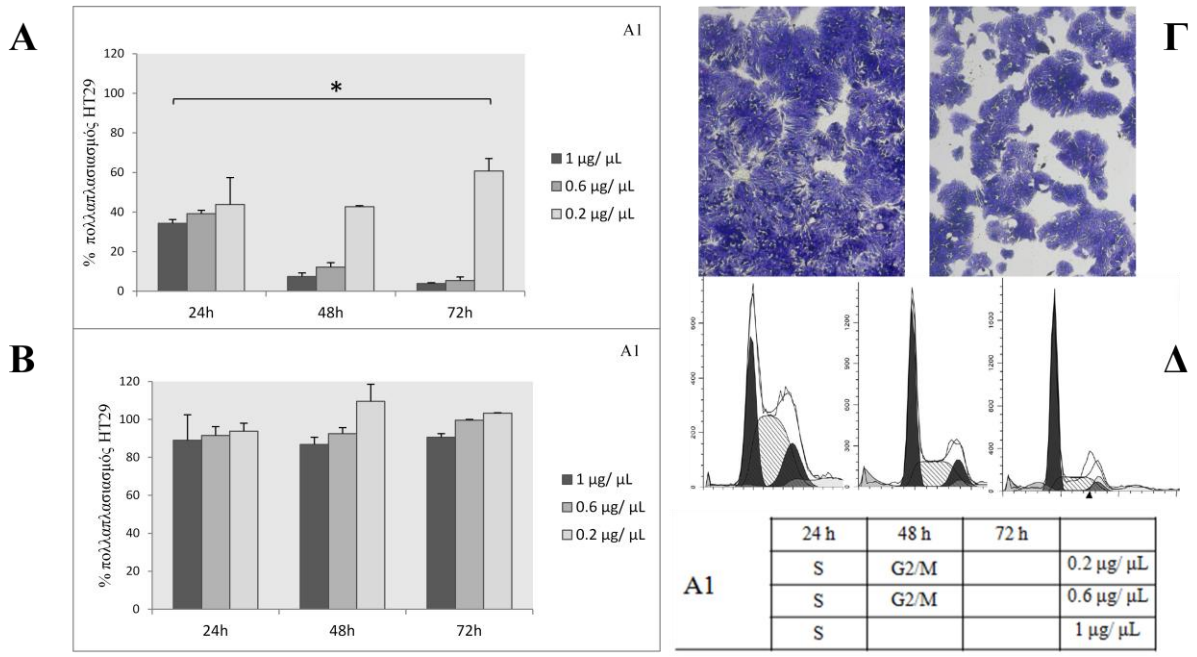
διυδροξυφαινυλοξικό οξύ (R=0.909, $P < 0.001$), το ροσμαρινικό οξύ (R=0.888, $P < 0.001$), καθώς και με το ολεανολικό οξύ (R=0.742, $P < 0.01$).

3.4 Μελέτη Επίδρασης των Αφεψημάτων σε Καρκινική Κυτταρική Σειρά του Παχέος Εντέρου (HT29)

Τα αφεψήματα βοτάνων μελετήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (HT29) σε τρεις συγκεντρώσεις (0.2, 0.6 και 1 μg/μL) και τρεις χρόνους επώασης (24, 48 και 72 h).

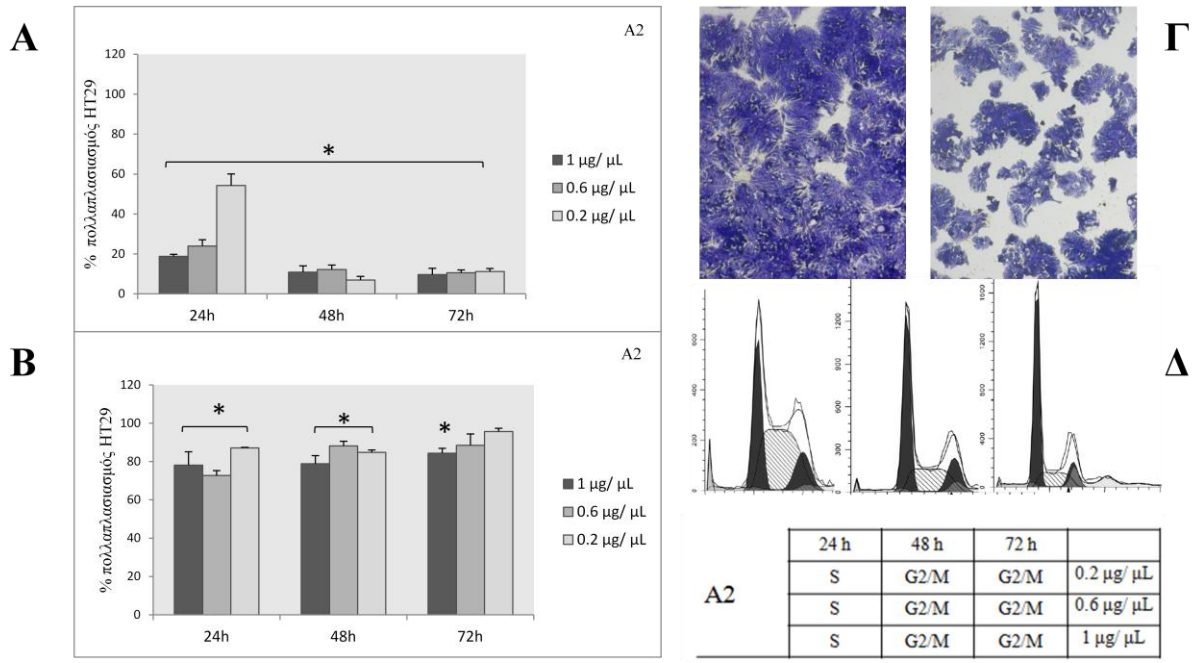
3.4.1 Επίδραση των Αφεψημάτων στον Πολλαπλασιασμό των Κυττάρων

Στις Εικόνες 3.18-3.30 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του συνόλου των αναλύσεων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της επίδρασης των αφεψημάτων στην ανάπτυξη και στον κυτταρικό κύκλο κυττάρων HT29. Στο Παράρτημα ΙΙ παρουσιάζεται η εκατοστιαία κατανομή του πληθυσμού των κυττάρων στις φάσεις του κύκλου ανάπτυξης, απουσία αφεψήματων, όπως προέκυψε από την αξιολόγηση του συνόλου των πειραμάτων.



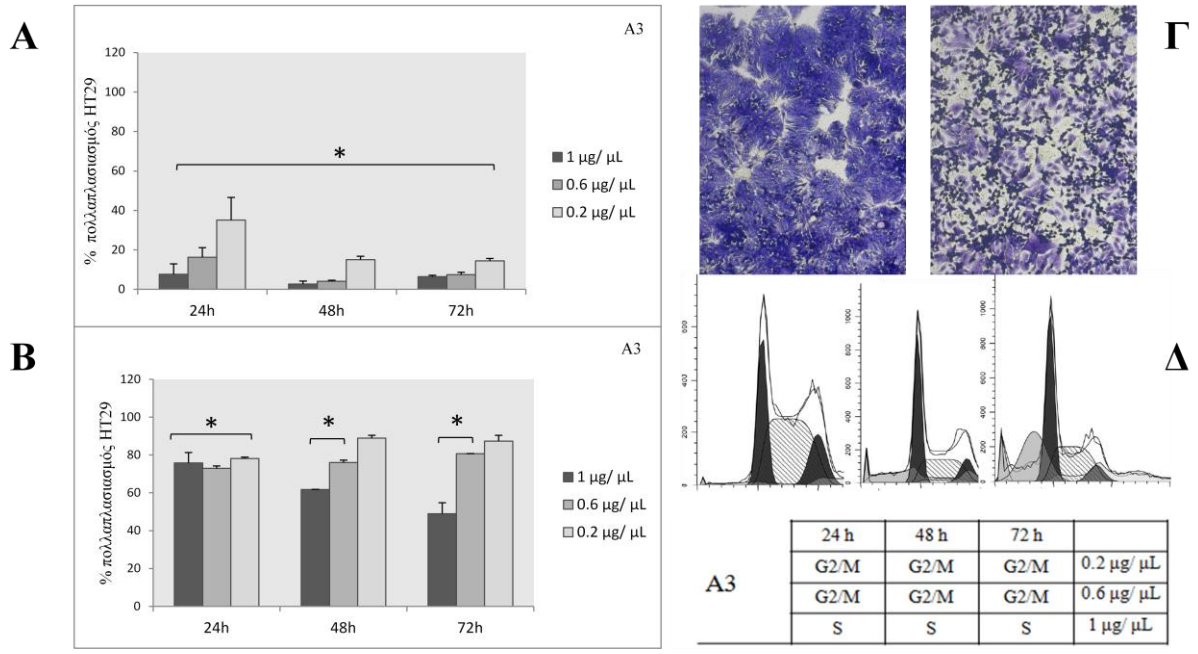
Εικόνα 3.18 Επίδραση αφεψήματος από Αντωναΐδα στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των HT29. (Α) Αξιολόγηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, (Β) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Crystal Violet. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δε χορηγήθηκε το αφέψημα και θεωρήθηκαν ότι είχαν 100% πολλαπλασιασμό, και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα, για 24, 48 και 72 h, σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL. (Γ) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Giemsa παρουσία (1 μg/μL) (δεξιά) και απουσία (αριστερά) του αφεψήματος, t=72 h, (Δ) Επίδραση του αφεψήματος στον κυτταρικό κύκλο (1 μg/μL), στον πίνακα σημειώνονται οι φάσεις του κύκλου στις οποίες υπήρξε αναστολή ($P < 0.05$), σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ η σκίαση με διαβαθμίσεις υποδηλώνει δοσοεξαρτώμενη σχέση. Οι τιμές είναι μ. όροι.±s.d τριών προσδιορισμών

Το αφέψημα της Αντωναΐδας παρουσίασε μερική ικανότητα να επεμβαίνει στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HT29. Η εκτίμηση της αναστολής ήταν περί το 10 %, χωρίς ωστόσο να επιβεβαιώνεται στατιστικά (Εικόνα 3.18Β). Αντίθετα, το αφέψημα φάνηκε να επιδρά έντονα στη μιτοχονδριακή λειτουργία (Εικόνα 3.18Α), σημειώνοντας αναστολή μεγαλύτερη από 90 %. Από την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου αναδείχθηκε η ικανότητα του αφεψήματος να αναστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων στη φάση S έπειτα από 24 h επώασης σε όλες τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν. Η παρουσία του αφεψήματος στην καλλιέργεια προκάλεσε αύξηση έως και 70 % της φάσης αντιγραφής, ενώ η επίδραση δε βρέθηκε να σχετίζεται θετικά με τη συγκέντρωση που εφαρμοστηκε στα HT29. Η παρατεταμένη παρουσία του αφεψήματος στην καλλιέργεια των HT29 προκάλεσε συσσώρευση των κυττάρων στη φάση G2/M. Η παρουσία αφεψήματος Αντωναΐδας στην καλλιέργεια προκάλεσε την αύξηση του πληθυσμού των κυττάρων έως 42 % στη φάση G2/M, εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο τα κύτταρα να εισέλθουν στη μιτωτική διαδικασία. Η αναστολή είχε αρνητική συσχέτιση με τη συγκέντρωση καθώς το φαινόμενο ήταν εντονότερο στη συγκέντρωση 0.2 μg/μL (καταγεγραμμένα ποσοστά: αρνητικός μάρτυρας 13 %, 0.2 μg/μL 18 %, 0.6 μg/μL 15 % και 1 μg/μL 15 %).



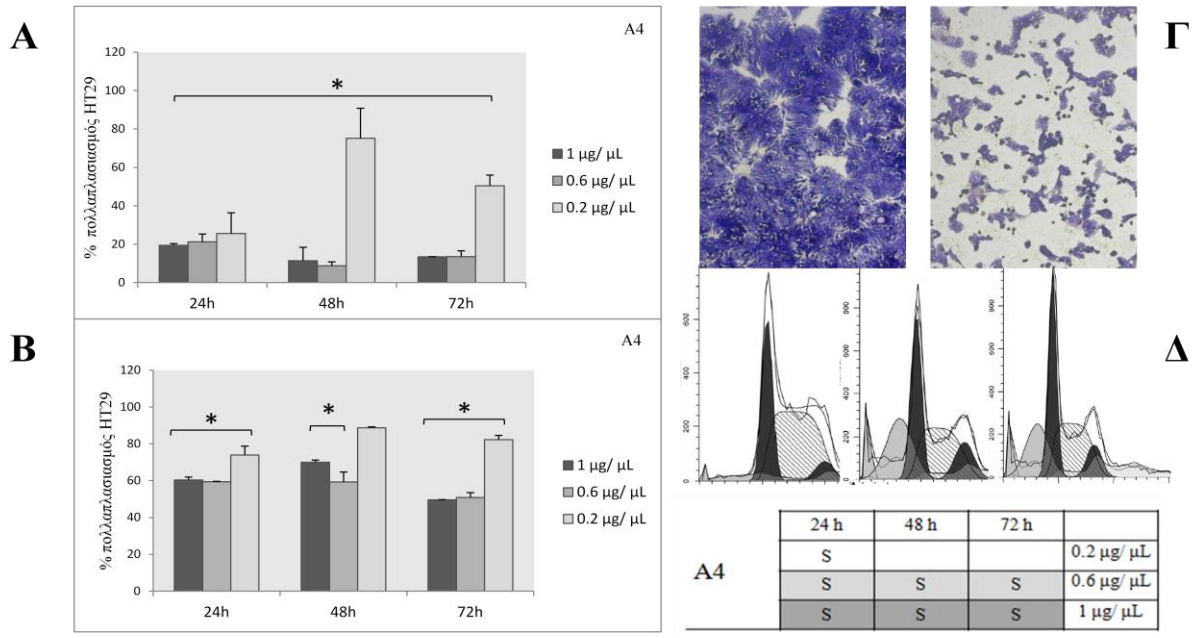
Εικόνα 3.19 Επίδραση αφεψήματος από Δενδρολίβανο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των HT29. (Α) Αξιολόγηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, (Β) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Crystal Violet. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δε χορηγήθηκε το αφέψημα και θεωρήθηκαν ότι είχαν 100% πολλαπλασιασμό, και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα, για 24, 48 και 72 h, σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL. (Γ) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Giemsa παρουσία (1 μg/μL) (δεξιά) και απουσία (αριστερά) του αφεψήματος, t=72 h, (Δ) Επίδραση του αφεψήματος στον κυτταρικό κύκλο (1 μg/μL), στον πίνακα σημειώνονται οι φάσεις του κύκλου στις οποίες υπήρξε αναστολή ($P < 0.05$), σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ η σκίαση με διαβαθμίσεις υποδηλώνει δοσοεξαρτώμενη σχέση. Οι τιμές είναι μ. όροι.±s.d τριών προσδιορισμών

Το αφέψημα Δενδρολίβανου παρουσίασε ικανότητα αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού έως και 25 % (Εικόνα 3.19Β). Η παρουσία του αφεψήματος φάνηκε να μεταβάλει τη μιτοχονδριακή λειτουργία των κυττάρων, έως και 90 % (Εικόνα 3.19Α). Η ικανότητα του αφεψήματος για αναστολή του πολλαπλασιασμού ήταν στατιστικά σημαντική στις 24 h επώασης σε όλες τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν. Η αναστολή φάνηκε να είναι αποτέλεσμα της συσσώρευσης των κυττάρων στη φάση S παρουσία αφεψήματος. Η αναστολή στη φάση αυτή δεν ήταν δοσοεξαρτώμενη κάθως το φαινόμενο σταθεροποιήθηκε ήδη από τη συγκέντρωση 0.2 μg/μL (καταγεγραμμένα ποσοστά: αρνητικός μάρτυρας 32 %, 0.2 μg/μL 52 %, 0.6 μg/μL 58 % και 1 μg/μL 54 %). Η παρατεταμένη παρουσία του αφεψήματος σε HT29 προκάλεσε επίσης αναστολή του πολλαπλασιασμού, η οποία ήταν στατιστικά σημαντική μόνο στη συγκέντρωση 1 μg/μL και στους δυο χρόνους που εξετάστηκαν. Τα ποσοστά ήταν 21 και 16 % για επώαση 48 και 72 h, αντίστοιχα. Η ανασταλτική δράση του αφεψήματος για περαιτέρω χρόνο σχετίστηκε με παραμονή/ συσσώρευση των κυττάρων στη φάση G2/M. Η αναστολή δεν ήταν δοσο- και χρονο-εξαρτώμενη καθώς η αύξηση υπολογίσθηκε περί το 50 % σε όλες τις συγκεντρώσεις.



Εικόνα 3.20 Επίδραση αφεψήματος από Δίκταμο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των HT29. (Α) Αξιολόγηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, (Β) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Crystal Violet. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δε χορηγήθηκε το αφέψημα και θεωρήθηκαν ότι είχαν 100% πολλαπλασιασμό, και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα, για 24, 48 και 72 h, σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL. (Γ) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Giemsa παρουσία (1 μg/μL) (δεξιά) και απουσία (αριστερά) του αφεψήματος, t=72 h, (Δ) Επίδραση του αφεψήματος στον κυτταρικό κύκλο (1 μg/μL), στον πίνακα σημειώνονται οι φάσεις του κύκλου στις οποίες υπήρξε αναστολή ($P < 0.05$), σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ η σκίαση με διαβαθμίσεις υποδηλώνει δοσοεξαρτώμενη σχέση. Οι τιμές είναι μ. όροι.±s.d τριών προσδιορισμών

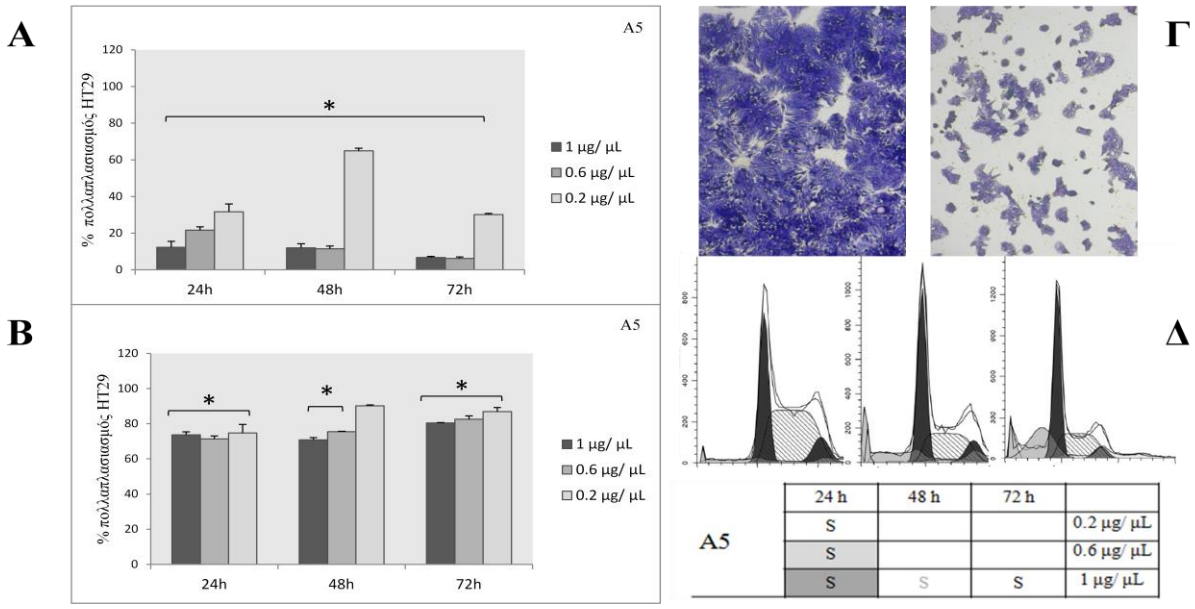
Το αφέψημα Δίκταμου παρουσίασε δοσοεξαρτώμενη ικανότητα αναστολής του πολλαπλασιασμού, που ήταν πιο έντονη μετά τις πρώτες 24 h επώασης, ενώ σχέση χρονοεξάρτησης παρατηρήθηκε μόνο για τη συγκέντρωση 1 μg/μL. Η ικανότητά του να επηρεάζει την ανάπτυξη της καλλιέργειας υπολογίσθηκε έως 51 % στη συγκέντρωση 1 μg/μL έπειτα από 72 h επώασης, όπως επιβεβαιώνεται και από την εικόνα της καλλιέργειας (Εικόνα 3.20Γ). Το αφέψημα ήταν επίσης πολύ δραστικό στην αναστολή της μιτοχονδριακής λειτουργίας των κυττάρων HT29 ήδη από τις πρώτες ώρες επώασης που μελετήθηκαν. Η δράση του στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων έγκειται στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου των HT29. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε η ύπαρξη σχέσης δόσης-απόκρισης. Η παρουσία του στις συγκεντρώσεις 0.2 και 0.6 μg/μL, προκάλεσε αναστολή στη φάση G2/M σε όλους τους χρόνους που μελετήθηκαν, ενώ στη συγκέντρωση 1 μg/μL στη φάση S. Πιθανώς η αναστολή στη φάση αυτή εκδηλώνεται πάνω από μια τιμή συγκέντρωσης αφεψήματος. Ειδικότερα, η αναστολή στη φάση G2/M δεν ήταν δοσοεξαρτώμενη κάθως το φαινόμενο σταθεροποιήθηκε ήδη από τη συγκέντρωση 0.2 μg/μL, ωστόσο η παρατεταμένη απουσία του αφεψήματος στην καλλιέργεια (72 h) στις συγκεντρώσεις 0.2 και 0.6 μg/μL βρέθηκε να σχετίζεται θετικά με την αναστολή στη φάση αυτή (αύξηση περί το 50 % ύστερα από 24 και 48 h έναντι περί το 80 % ύστερα από 72 h).



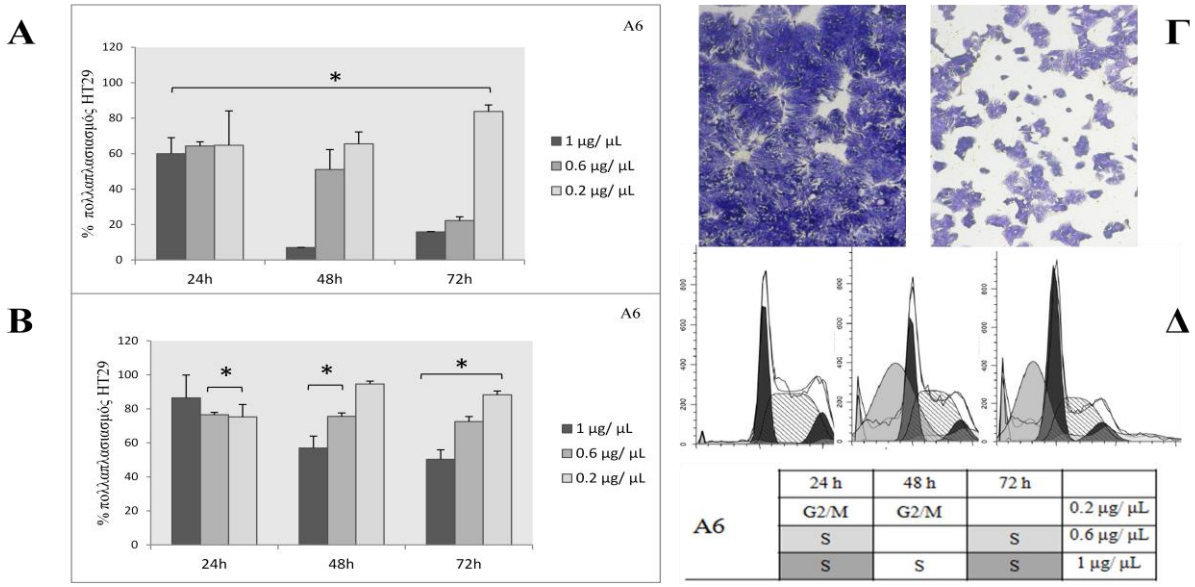
Εικόνα 3.21 Επίδραση αφεψήματος από Θρύμπα στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των HT29. (Α) Αξιολόγηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, (Β) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Crystal Violet. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δε χορηγήθηκε το αφέψημα και θεωρήθηκαν ότι είχαν 100% πολλαπλασιασμό, και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα, για 24, 48 και 72 h, σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL. (Γ) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Giemsa παρουσία (1 μg/μL) (δεξιά) και απουσία (αριστερά) του αφεψήματος, t=72 h, (Δ) Επίδραση του αφεψήματος στον κυτταρικό κύκλο (1 μg/μL), στον πίνακα σημειώνονται οι φάσεις του κύκλου στις οποίες υπήρξε αναστολή ($P < 0.05$), σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ η σκίαση με διαβαθμίσεις υποδηλώνει δοσοεξαρτώμενη σχέση. Οι τιμές είναι μ. όροι.±s.d τριών προσδιορισμών

Στην Εικόνα 3.21 παρουσιάζεται η ικανότητα του αφεψήματος Θρύμπας να επιδρά στον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου. Η αναστολή του πολλαπλασιασμού από το αφέψημα υπερεκτιμήθηκε μέσω ελέγχου της μιτοχονδριακής λειτουργίας, καθώς με χρήση της μεθόδου MTT σημειώθηκε αναστολή περί το 80 % για τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν ήδη από τις πρώτες 24 h επώασης. Η παρουσία του στην καλλιέργεια σε συγκεντρώσεις 0.6 και 1 μg/μL προκάλεσε τις ίδιες τιμές αναστολής (έως 50 %) σε όλους τους χρόνους που μελετήθηκαν επισημαίνοντας τον κορεσμό της δράσης του ήδη από τη συγκέντρωση 0.6 μg/μL. Το αφέψημα ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό και στη συγκέντρωση 0.2 μg/μL κατά 23 %. Η παρατεταμένη παρουσία του αφεψήματος στην καλλιέργεια δε συσχετίστηκε με μεγαλύτερα ποσοστά αναστολής, δηλώνοντας απουσία χρονοεξάρτησης. Τέλος, η δράση στην ανάπτυξη της καλλιέργειας πιθανώς να οφείλεται στην έντονη συσσώρευση των κυττάρων στη φάση της αντιγραφής. Η αναχαίτιση των κυττάρων στη φάση S ήταν δοσοεξαρτώμενη, δε σημειώθηκε ωστόσο σχέση χρονοεξάρτησης επιβεβαιώνοντας τις προηγούμενες παρατηρήσεις. Η αναστολή που καταγράφηκε ήταν μέγιστη ύστερα από 24 h επώασης, ενώ η κατανομή σε αυτή τη φάση του κύκλου σημείωσε τα εξής ποσοστά: αρνητικός μάρτυρας 32 %, 0.2 μg/μL 50 %, 0.6 μg/μL 54 % και 1 μg/μL 58 %.

Το αφέψημα Θυμαριού ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων χωρίς να εμφανίζει σχέση δοσο- και χρόνο-εξάρτησης (Εικόνα 3.22). Η αναστολή του πολλαπλασιασμού που σημειώθηκε από το αφέψημα με χρήση της μεθόδου MTT (Εικόνα 3.22A) και με σήμανση των ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Crystal Violet (Εικόνα 3.22B) παρουσίασε σημαντικές αποκλίσεις τονίζοντας την επίδραση του αφεψήματος στη λειτουργία των μιτοχονδρίων. Η αναστολή που σημειώθηκε για τη συγκέντρωση 1 μg/μL ήταν περίπου έως 30 % ύστερα από 24 h επώασης και φάνηκε να είναι αποτέλεσμα της συσσώρευσης των κυττάρων στη φάση S, η οποία, αντίθετα με την αναστολή του πολλαπλασιασμού, βρέθηκε να έχει θετική συσχέτιση με τη συγκέντρωση του αφεψήματος. Συγκεκριμένα, η αύξηση στη φάση αντιγραφής ήταν 40, 63 και 81 % στις συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL, αντίστοιχα. Η εξέλιξη της αναστολής στη φάση αντιγραφής (η οποία καταγράφεται κυρίως για τη συγκέντρωση 1 μg/μL), ομοίως με την αναστολη του πολλαπλασιασμού, δεν παρουσίαζει θετική συσχέτιση με το χρόνο, ερμηνεύοντας τις παρατηρήσεις (αύξηση 31 % έπειτα από 72 h στις συγκέντρωση 1 μg/μL).



Εικόνα 3.22 Επίδραση αφεψήματος από Θυμάρι στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των HT29. (Α) Αξιολόγηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, (Β) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Crystal Violet. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δε χορηγήθηκε το αφέψημα και θεωρήθηκαν ότι είχαν 100% πολλαπλασιασμό, και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα, για 24, 48 και 72 h, σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL. (Γ) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Giemsa παρουσία (1 μg/μL) (δεξιά) και απουσία (αριστερά) του αφεψήματος, t=72 h, (Δ) Επίδραση του αφεψήματος στον κυτταρικό κύκλο (1 μg/μL), στον πίνακα σημειώνονται οι φάσεις του κύκλου στις οποίες υπήρξε αναστολή ($P < 0.05$), σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ η σκίαση με διαβαθμίσεις υποδηλώνει δοσοεξαρτώμενη σχέση. Οι τιμές είναι μ. όροι.±s.d τριών προσδιορισμών

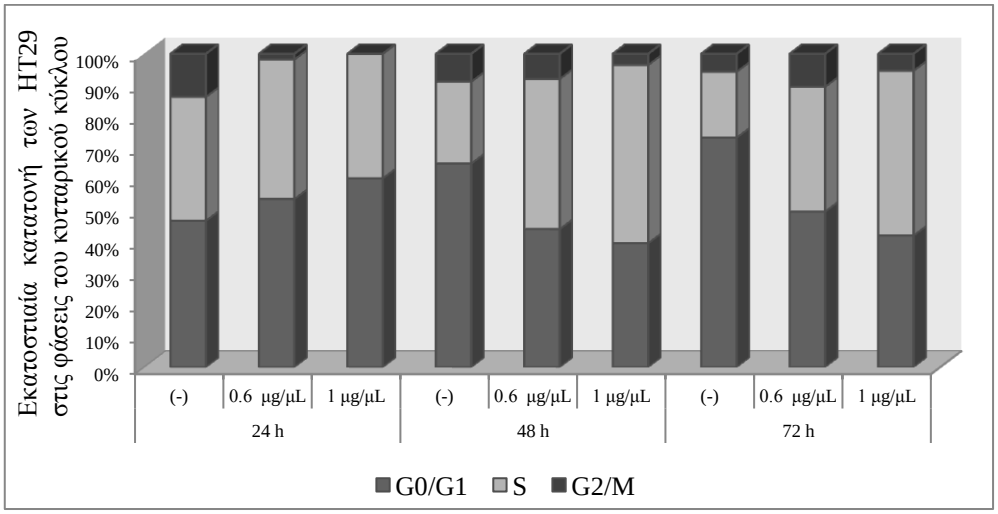


Εικόνα 3.23 Επίδραση αφεψήματος από Μαντζουράνα στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των HT29. (Α) Αξιολόγηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, (Β) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Crystal Violet. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δε χορηγήθηκε το αφέψημα και θεωρήθηκαν ότι είχαν 100% πολλαπλασιασμό, και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα, για 24, 48 και 72 h, σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL. (Γ) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Giemsa παρουσία (1 μg/μL) (δεξιά) και απουσία (αριστερά) του αφεψήματος, t=72 h, (Δ) Επίδραση του αφεψήματος στον κυτταρικό κύκλο (1 μg/μL), στον πίνακα σημειώνονται οι φάσεις του κύκλου στις οποίες υπήρξε αναστολή ($P < 0.05$), σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ η σκίαση με διαβαθμίσεις υποδηλώνει δοσοεξαρτώμενη σχέση. Οι τιμές είναι μ. όροι.±s.d τριών προσδιορισμών

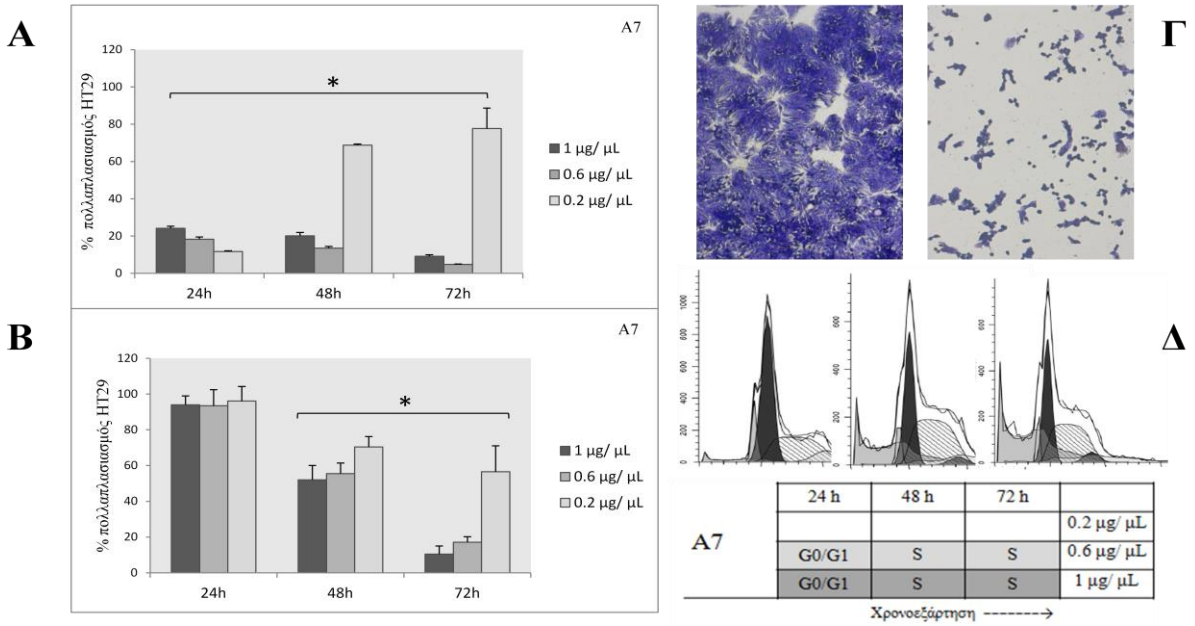
Το αφέψημα Μαντζουράνας επίσης ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων με δοσο- και χρόνο-εξαρτώμενο τρόπο (Εικόνα 3.23 Α και 3.23 Β). Η αναστολή της ομαλής λειτουργίας των μιτοχονδρίων που εκτιμήθηκε με τη μέθοδο MTT φάνηκε να σχετίζεται με το χρόνο επώασης. Η επίδραση του αφεψήματος στα μιτοχόνδρια σημειώνεται στη 1 μg/μL, ενώ επώαση με μικρότερες συγκεντρώσεις δεν φαίνεται να αναστέλλει τη λειτουργία τους καθώς δεν παρατηρούνται σημεντικές μεταβολές μεταξύ των αποτελεσμάτων των μεθόδων MTT και χρώσης των κυττάρων. Η ικανότητά του να επηρεάζει την ανάπτυξη της καλλιέργειας υπολογίσθηκε έως 50 % στη συγκέντρωση 1 μg/μL έπειτα από 72 h επώασης, όπως επιβεβαιώνεται και από την εικόνα της καλλιέργειας (Εικόνα 3.23Γ). Η επώαση με 0.2 και 0.6 μg/μL αφεψήματος προκάλεσε επίσης αναστολή έως 25 και 28 %, αντίστοιχα. Η ανασταλτική δράση του αφεψήματος έγκειται στη μεταβολή κατανομής του πληθυσμού στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου παρουσία του στην καλλιέργεια. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε η ύπαρξη δόσης- απόκρισης. Η παρουσία του σε συγκέντρωση 0.2 μg/μL, προκάλεσε αναστολή στη φάση G2/M σε όλους τους χρόνους που μελετήθηκαν (για τις 72 h δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά). Η αναστολή στη φάση αυτή δεν ήταν χρονοεξαρτώμενη κάθως το φαινόμενο σταθεροποιήθηκε ήδη από τις 24 h επώασης. Αντίθετα, η παρουσία του αφεψήματος στην καλλιέργεια των κυττάρων HT29 σε συγκεντρώσεις 0.6 και 1 μg/μL προκάλεσε συσσώρευση στη φάση S. Η επίδραση του αφεψήματος ήταν δοσοεξαρτώμενη παρουσιάζοντας μέγιστη αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση αντιγραφής, ήδη από τις πρώτες 24 h επώασης. Τα ποσοστά κατανομής στη φάση S επειτα από 24 h επώασης με το αφέψημα ήταν: αρνητικός μάρτυρας 32 %, 0.6 μg/μL 53 % και 1 μg/μL 61 %. Με βάση τα παραπάνω το αφέψημα Μαντζουράνας προκαλεί αναστολή της φάσης S η οποία εκδηλώνεται πάνω από μια ορισμένη τιμή συγκέντρωσης αφεψήματος.

Το αφέψημα Μελισσόχορτου ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων με δοσο- και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο. Από την παρατήρηση της εικόνας της καλλιέργειας παρουσία του αφεψήματος (Εικόνα 3.24Γ) φαίνεται ότι η αναστολή που σημειώθηκε ήταν $>$ 80 % (ύστερα από 72 h επώασης), γεγονός που επαληθεύεται από τη συνολική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Το αφέψημα προκάλεσε επίσης μεταβολή της λειτουργίας των μιτοχονδρίων στις συγκεντρώσεις 0.6 και 1 μg/μL, όπως επαληθεύεται από τις διαφορές που παρατηρήθηκαν μεταξύ των μεθόδων (Εικόνα 3.24Α και 3.24Β). Η αναστολή του πολλαπλασιασμού που καταγράφηκε ύστερα από 24 h επώασης με το αφέψημα, αν και δεν ήταν στατιστικά σημαντική φαίνεται εν μέρει να είναι αποτέλεσμα της αναχαίτισης των κυττάρων στη φάση G0/G1 του κύκλου (Εικόνα 3.24Δ). Η εξέλιξη της αναστολής ύστερα από 48 και 72 h επώασης με το

αφέψημα ήταν αποτέλεσμα της συσσώρευσης των κυττάρων στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Η αύξηση που καταγράφηκε στη φάση αυτή παρουσία αφεψήματος Μελισσόχορτου, σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα ήταν μεγαλύτερη από 100 % (Διάγραμμα 3.14). Η αναστολή στη φάση αυτή ήταν δοσο- και χρονο- εξαρτώμενη.

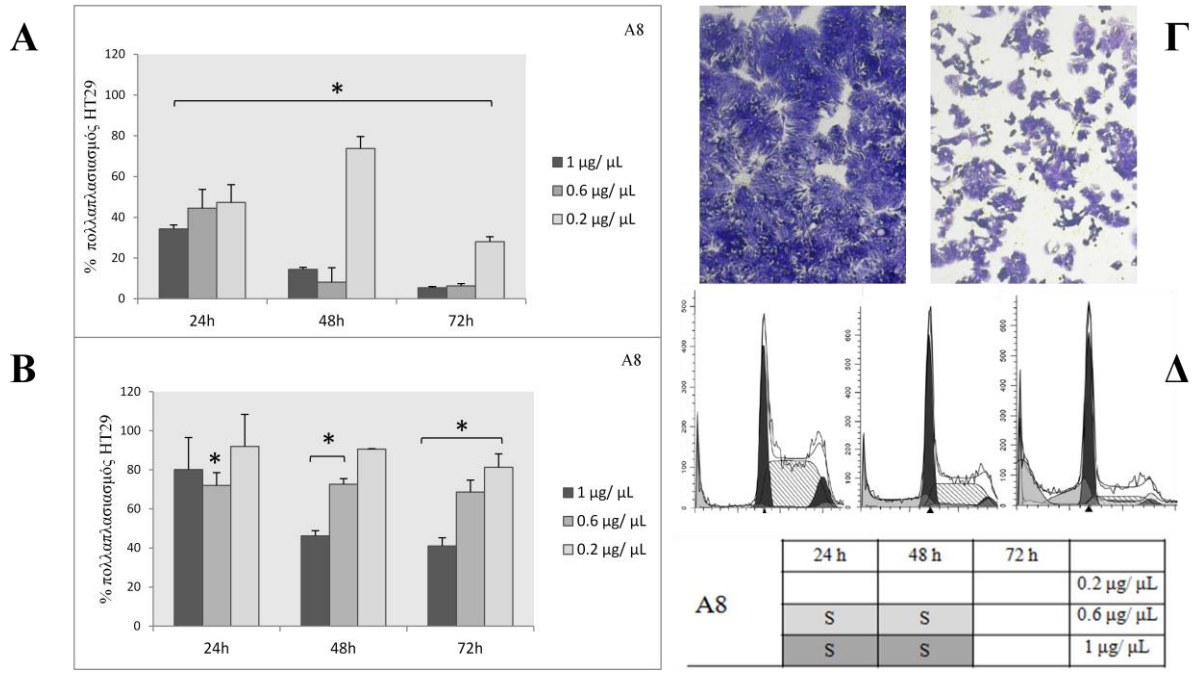


Διάγραμμα 3.14 Κατανομή των κυττάρων HT29 στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου παρουσία αφεψήματος Μελισσόχορτου έπειτα από 24, 48 και 72 h επώασης, σε συγκεντρώσεις 0.6 και 1 μg/μL



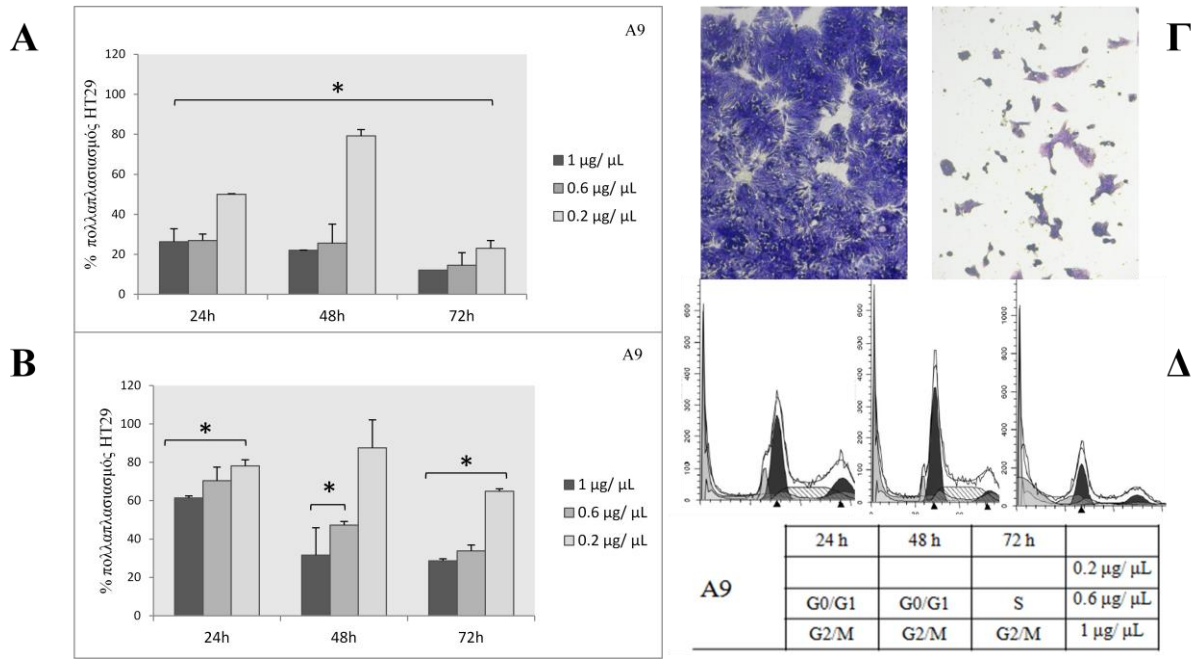
Εικόνα 3.24 Επίδραση αφεψήματος από Μελισσόχορτο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των HT29. (A) Αξιολόγηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, (B) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Crystal Violet. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δε χορηγήθηκε το αφέψημα και θεωρήθηκαν ότι είχαν 100% πολλαπλασιασμό, και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα, για 24, 48 και 72 h, σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL. (Γ) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Giemsa παρουσία (1 μg/μL) (δεξιά) και απουσία (αριστερά) του αφεψήματος, t=72 h, (Δ) Επίδραση του αφεψήματος στον κυτταρικό κύκλο (1 μg/μL), στον πίνακα σημειώνονται οι φάσεις του κύκλου στις οποίες υπήρξε αναστολή ($P < 0.05$), σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ η σκίαση με διαβαθμίσεις υποδηλώνει δοσοεξαρτώμενη σχέση. Οι τιμές είναι μ. όροι.±s.d τριών προσδιορισμών

Το αφέψημα Ρίγανης επέδειξε ικανότητα αναστολής του πολλαπλασιασμού των κυττάρων HT29 (Εικόνα 3.25). Η σχέση δοσοεξάρτησης ήταν εμφανής μετά από επώαση 48 h με το αφέψημα, αντίθετα ο χρόνος επώασης δε φάνηκε να σχετίζεται με την παρατηρούμενη αναστολή. Τα ποσοστά που σημειώθηκαν ήταν 19, 32, και 59 % για τις συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL, αντίστοιχα (72 h επώασης). Το αφέψημα προκάλεσε επίσης μεταβολή της λειτουργίας των μιτοχονδρίων, όπως επαληθεύεται από τις διαφορές που παρατηρήθηκαν μεταξύ των μεθόδων (Εικόνα 3.25Α και 3.25Β). Η αναστολή φαίνεται να είναι αποτέλεσμα αλλαγών στην κατανομή των κυττάρων στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα, ήδη από τις 24 h επώασης, αν και η αναστολή του πολλαπλασιασμού ήταν στατιστικά σημαντική μόνο για τη συγκέντρωση 0.6 μg/μL, η παρουσία του αφεψήματος στην καλλιέργεια προκάλεσε συσσώρευση των HT29 στη φάση S (καταγεγραμμένα ποσοστά: αρνητικός μάρτυρας 45 %, 0.6 μg/μL 59 % και 1 μg/μL 61 %). Η αναστολή ήταν δοσοεξαρτώμενη και φάνηκε να διατηρείται, χωρίς να παρουσιάζει σχέση χρονοεξάρτησης, έπειτα από 48 h (καταγεγραμμένα ποσοστά: αρνητικός μάρτυρας 37 %, 0.6 μg/μL 43 % και 1 μg/μL 47 %). Η αναχαίτιση των κυττάρων στις φάσεις του κύκλου δεν ήταν στατιστικά σημαντική στις 72 h επώασης με το αφέψημα Ρίγανης.



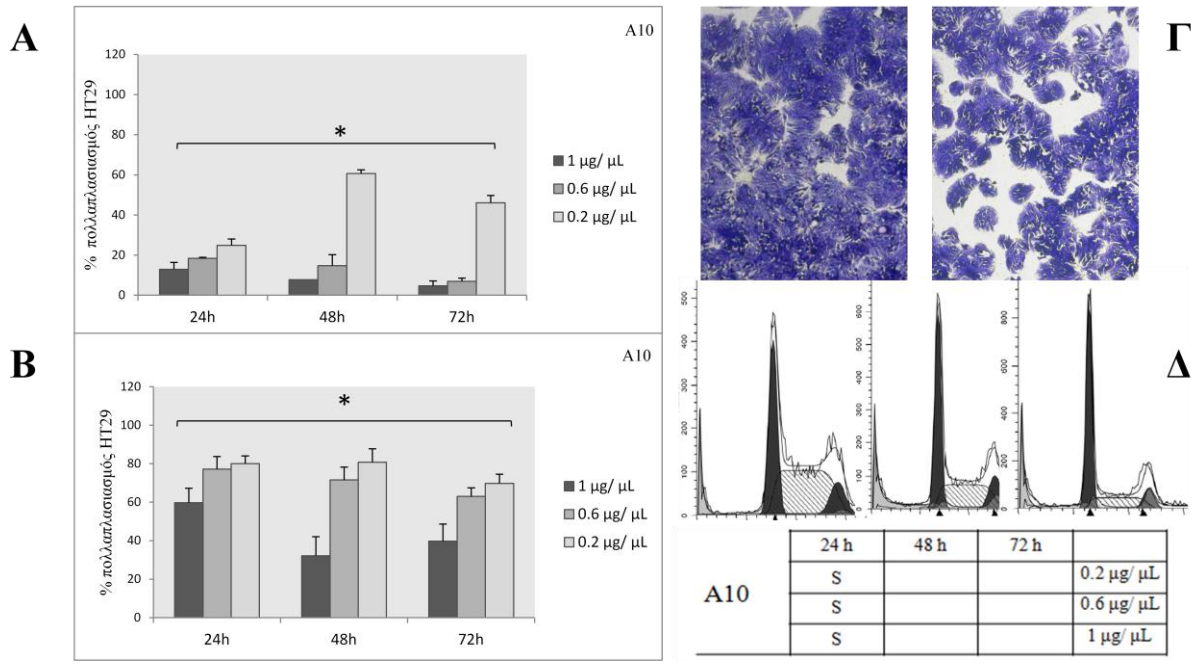
Εικόνα 3.25 Επίδραση αφεψήματος από Ρίγανη στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των HT29. (Α) Αξιολόγηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, (Β) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Crystal Violet. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δε χορηγήθηκε το αφέψημα και θεωρήθηκαν ότι είχαν 100% πολλαπλασιασμό, και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα, για 24, 48 και 72 h, σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL. (Γ) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Giemsa παρουσία (1 μg/μL) (δεξιά) και απουσία (αριστερά) του αφεψήματος, t=72 h, (Δ) Επίδραση του αφεψήματος στον κυτταρικό κύκλο (1 μg/μL), στον πίνακα σημειώνονται οι φάσεις του κύκλου στις οποίες υπήρξε αναστολή ($P < 0.05$), σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ η σκίαση με διαβαθμίσεις υποδηλώνει δοσοεξαρτώμενη σχέση. Οι τιμές είναι μ. όροι.±s.d τριών προσδιορισμών

Το αφέψημα Σπαθόχορτου παρουσίασε και αυτό ικανότητα αναστολής του πολλαπλασιασμού των κυττάρων HT29 (Εικόνα 3.26). Συγκεκριμένα, η παρουσία του στην καλλιέργεια ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων με δοσο- και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο, όπως επαληθεύεται από το σύνολο των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν. Προκαλώντας ταυτόχρονα μεταβολή στη λειτουργία των μιτοχονδρίων, το αφέψημα (1 μg/μL) περιόρισε την ικανότητα πολλαπλασιασμού περί το 39 , 69 και 72 % έπειτα από 24, 48, 72 h επώασης, αντίστοιχα. Η έντονα ανασταλτική δράση του αφεψήματος είναι εμφανής παρατηρώντας την εικόνα της καλλιέργειας παρουσία αφεψήματος (Εικόνα 3.26Γ). Η στατιστικά σημαντική αναστολή του πολλαπλασιασμού που σημειώθηκε για όλους τους χρόνους επώασης που μελετήθηκαν παρουσία αφεψήματος, φάνηκε να σχετίζεται με τη συσσώρευση των κυττάρων στις φάσεις του κύκλου. Συγκεκριμένα, το αφέψημα αναχαίτισε τα κύτταρα στη φάση G0/G1 ύστερα από επώαση στη συγκέντρωση 0.6 μg/μL (αύξηση έως 40 %) και στη φάση G2/M όταν καλλιεργήθηκαν παρουσία αφεψήματος σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (αύξηση έως 150 % έπειτα από 72 h επώασης με 1 μg/μL αφεψήματος).



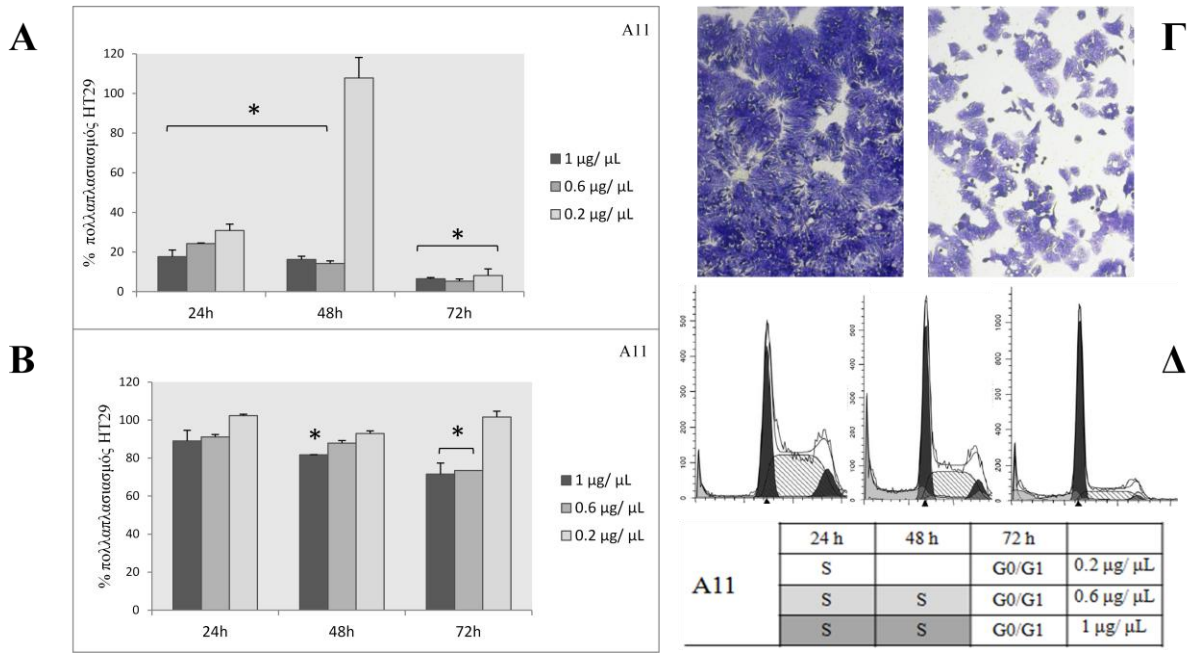
Εικόνα 3.26 Επίδραση αφεψήματος από Σπαθόχορτο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των HT29. (Α) Αξιολόγηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, (Β) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Crystal Violet. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δε χορηγήθηκε το αφέψημα και θεωρήθηκαν ότι είχαν 100% πολλαπλασιασμό, και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα, για 24, 48 και 72 h, σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL. (Γ) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Giemsa παρουσία (1 μg/μL) (δεξιά) και απουσία (αριστερά) του αφεψήματος, t=72 h, (Δ) Επίδραση του αφεψήματος στον κυτταρικό κύκλο (1 μg/μL), στον πίνακα σημειώνονται οι φάσεις του κύκλου στις οποίες υπήρξε αναστολή ($P < 0.05$), σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ η σκίαση με διαβαθμίσεις υποδηλώνει δοσοεξαρτώμενη σχέση. Οι τιμές είναι μ. όροι.±s.d τριών προσδιορισμών

Το αφέψημα Σιδερίτη ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων με δοσοεξαρτώμενο τρόπο (Εικόνα 3.13). Το αφέψημα ανέστειλε τη μιτοχονδριακή λειτουργία των κυττάρων σε ποσοστά έως και περισσότερο από 90 % (Εικόνα 3.27Α). Η αναστολή ήταν πιο έντονη στις συγκεντρώσεις 0.6 και 1 μg/μL, σε σχέση με τη συγκέντρωση 0.2 μg/μL. Όπως προκύπτει και από την παρατήρηση της εικόνας της καλλιέργειας, το αφέψημα προκάλεσε αναστολή της ανάπτυξης των HT29 περί το 60 %. Η επίδραση του αφεψήματος στην πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων στις συγκεντρώσεις 0.2 και 0.6 μg/μL ήταν έως 37 % έπειτα από 72 h επώασης. Η ανασταλτική δράση του αφεψήματος πιθανώς σχετίζεται με την συσσώρευση των κυττάρων στη φάση S του κυτταρικού κύκλου έπειτα από 24 h επώασης. Η αναστολή στη φάση αυτή δεν ήταν δοσοεξαρτώμενη κάθως το φαινόμενο σταθεροποιήθηκε ήδη από τη συγκέντρωση 0.2 μg/μL. Τα ποσοστά που καταγράφηκαν για τις 24 h στη φάση αντιγραφής ήταν: αρνητικός μάρτυρας 45 %, 0.2 μg/μL 54 %, 0.6 μg/μL 58 % και 1 μg/μL 58 %. Ολοκληρώνοντας, η μεταβολή στην κατανομή του πληθυσμού παρουσία αφεψήματος επί 48 h και 72 h δεν ήταν στατιστικά σημαντική.



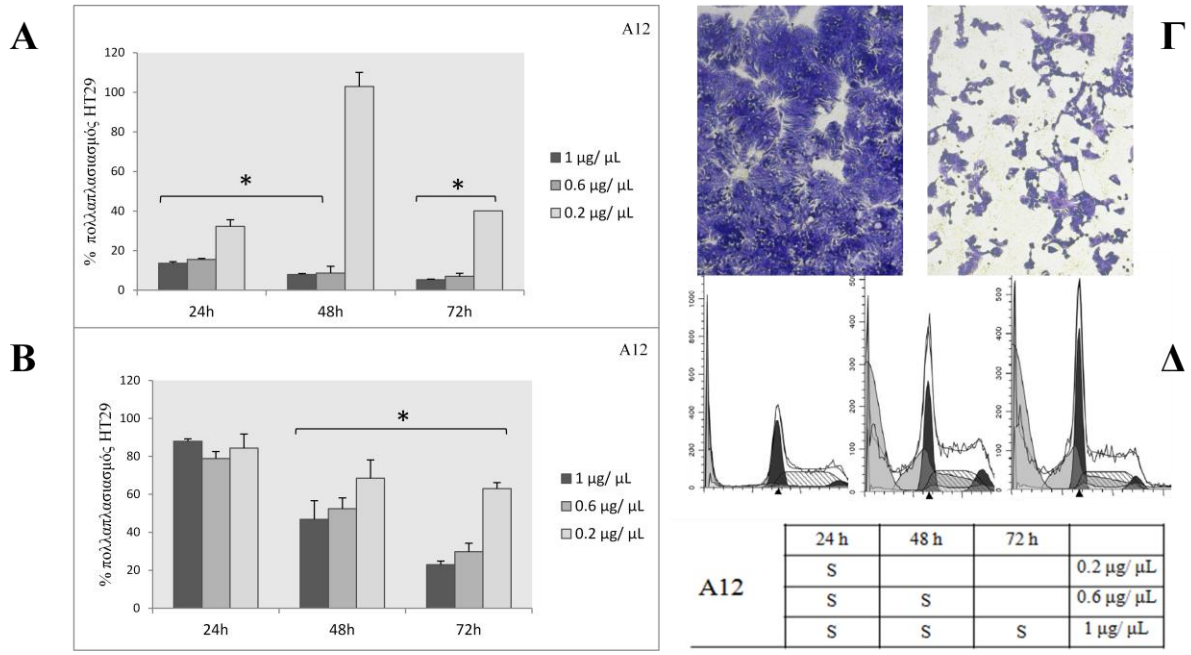
Εικόνα 3.27 Επίδραση αφεψήματος από Τσάι βουνού στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των HT29. (Α) Αξιολόγηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, (Β) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Crystal Violet. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δε χορηγήθηκε το αφέψημα και θεωρήθηκαν ότι είχαν 100% πολλαπλασιασμό, και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα, για 24, 48 και 72 h, σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL. (Γ) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Giemsa παρουσία (1 μg/μL) (δεξιά) και απουσία (αριστερά) του αφεψήματος, t=72 h, (Δ) Επίδραση του αφεψήματος στον κυτταρικό κύκλο (1 μg/μL), στον πίνακα σημειώνονται οι φάσεις του κύκλου στις οποίες υπήρξε αναστολή ($P < 0.05$), σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ η σκίαση με διαβαθμίσεις υποδηλώνει δοσοεξαρτώμενη σχέση. Οι τιμές είναι μ. όροι.±s.d τριών προσδιορισμών

Το αφέψημα Φασκόμηλου ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων με χρονο-εξαρτώμενο τρόπο (Εικόνα 3.28). Η ένταση της αναστολής εκτιμάται υψηλότερη μέσω της αξιολόγησης των αποτελεσμάτων που προέκυψαν με χρήση της μεθόδου MTT (Εικόνα 3.28Α), πιθανώς διότι το αφέψημα επιδρά έντονα στη μιτοχονδριακή λειτουργία των κυττάρων HT29. Το αφέψημα Φασκόμηλου, προκάλεσε μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων έως και 30 % έπειτα από 72 h επώασης σε συγκέντρωση 1 μg/μL. Η παρουσία του αφεψήματος στην καλλιέργεια (για 24 και 48 h) προκάλεσε την αύξηση του πληθυσμού των κύτταρων στη φάση S. Η αναστολής της φάσης αντιγραφής παρουσίασε θετική συσχέτικη με τη συγκέντρωση του αφεψήματος (καταγεγραμμένα ποσοστά: αρνητικός μάρτυρας 45 %, 0.2 μg/μL 53 %, 0.6 μg/μL 55 % και 1 μg/μL 57 %), χωρις ωστόσο να παρατηρηθεί χρονοεξαρτώμενη επίδραση ύστερα από 48 h επωασης (διατήρηση του ποσοστού αύξησης περί το 25 %). Αντίθετα η παρατεταμένη παραμονή του στην καλλιέργεια σχετίστηκε με συσσώρευση των κυττάρων στη φάση G0/G1. Σημειώνεται ότι, η αναστολή στη φάση G0/G1 δεν ήταν δοσοεξαρτώμενη κάθως το φαινόμενο σταθεροποιήθηκε ήδη από τη συγκέντρωση 0.2 μg/μL.



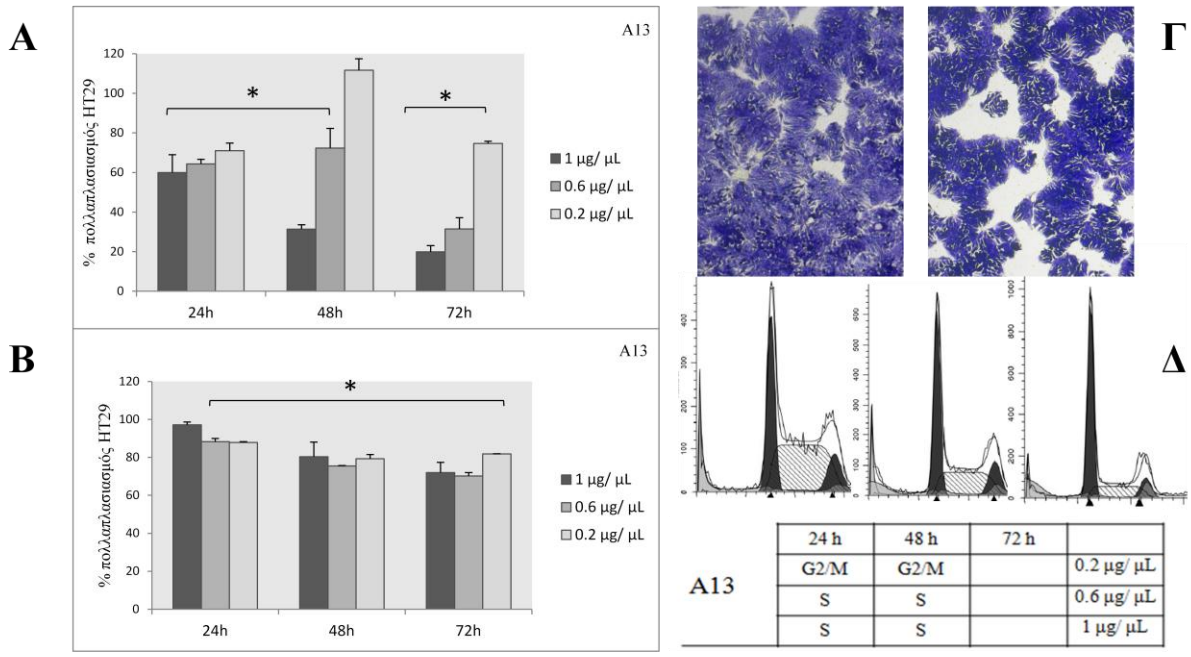
Εικόνα 3.28 Επίδραση αφεψήματος από Φασκόμηλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των HT29. (Α) Αξιολόγηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, (Β) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Crystal Violet. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δε χορηγήθηκε το αφέψημα και θεωρήθηκαν ότι είχαν 100% πολλαπλασιασμό, και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα, για 24, 48 και 72 h, σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL. (Γ) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Giemsa παρουσία (1 μg/μL) (δεξιά) και απουσία (αριστερά) του αφεψήματος, t=72 h, (Δ) Επίδραση του αφεψήματος στον κυτταρικό κύκλο (1 μg/μL), στον πίνακα σημειώνονται οι φάσεις του κύκλου στις οποίες υπήρξε αναστολή ($P < 0.05$), σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ η σκίαση με διαβαθμίσεις υποδηλώνει δοσοεξαρτώμενη σχέση. Οι τιμές είναι μ. όροι.±s.d τριών προσδιορισμών

Το αφέψημα από Φλισκούνι ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων με δοσο- και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο (Εικόνα 3.29). Το αφέψημα επηρέασε τη μιτοχονδριακή λειτουργία των κυττάρων έπειτα από 24 h επώασης σε όλες τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν (Εικόνα 3.29Α). Η αναστολή του πολλαπλασιασμού, που υπολογίστηκε βάσει του αριθμού των κυττάρων (Εικόνα 3.29Β) ήταν στατιστικά σημαντική έπειτα από επώαση 48 h. Τα ποσοστά ήταν 32, 48 και 54 % στις συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL, αντίστοιχα. Η δράση του αφεψήματος στην ανάπτυξη της καλλιέργειας ήταν εντονότερη έπειτα από 72 h επώασης με αυτό. Τα ποσοστά κατά αύξουσα συγκέντρωση επώασης ήταν 37, 71 και 78 %. Η παρουσία του αφεψήματος από Φλισκούνι ήδη από τις 24 h σχετίστηκε με συσσώρευση των κυττάρων στη φάση S. Η αναχαίτιση των κυττάρων στη φάση αυτή παραμένει έπειτα από 48 και 72 h επώασης, παρουσιάζοντας θετική συσχέτιση με το χρόνο μόνο ύστερα από παρουσία του αφεψήματος στην καλλιέργεια των HT29 στη συγκέντρωση 1 μg/μL. Τα ποσοστά αύξηση της φάση S που σημειώθηκαν στη συγκέντρωση αυτή ήταν 14, 20 και 44 %, έπειτα από 24, 48 και 72 h επώασης, αντίστοιχα. Για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις μου μελετήθηκαν, η αύξηση, όπου ήταν στατιστικά σημαντική, υπολογίσθηκε περί το 10 %.



Εικόνα 3.29 Επίδραση αφεψήματος από Φλισκούνι στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των HT29. (Α) Αξιολόγηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, (Β) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Crystal Violet. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δε χορηγήθηκε το αφέψημα και θεωρήθηκαν ότι είχαν 100% πολλαπλασιασμό, και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα, για 24, 48 και 72 h, σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL. (Γ) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Giemsa παρουσία (1 μg/μL) (δεξιά) και απουσία (αριστερά) του αφεψήματος, t=72 h, (Δ) Επίδραση του αφεψήματος στον κυτταρικό κύκλο (1 μg/μL), στον πίνακα σημειώνονται οι φάσεις του κύκλου στις οποίες υπήρξε αναστολή ($P < 0.05$), σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ η σκίαση με διαβαθμίσεις υποδηλώνει δοσοεξαρτώμενη σχέση. Οι τιμές είναι μ. όροι.±s.d τριών προσδιορισμών

Το αφέψημα από Χαμομήλι ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HT29 (Εικόνα 3.30). Ταυτόχρονα με την αναστολή του πολλαπλασιασμού το αφέψημα επηρέασε τη λειτουργία των μιτοχονδρίων κυρίως στις συγκεντρώσεις 0.6 και 1 μg/μL, όπως επαληθεύεται από τις διαφορές που παρατηρήθηκαν μεταξύ των μεθόδων εκτίμηση της ικανότητας πολλαπλασιασμού. Η αναστολή στην ανάπτυξη της καλλιέργειας ήταν μεγαλύτερη έπειτα από 48 και 72 h επώασης, σημειώνοντας ποσοστά περί το 30 %. Η επίδραση του αφεψήματος στην ανάπτυξη των κυττάρων HT29 δε σχετίστηκε θετικά με τη συγκέντρωση και το χρόνο επώασης. Η παρουσία του σε συγκέντρωση 0.2 μg/μL, προκάλεσε αναστολή στη φάση G2/M σε όλους τους χρόνους που μελετήθηκαν (για τις 72 h δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά), ενώ στη συγκέντρωση 0.6 και 1 μg/μL στη φάση S.



Εικόνα 3.30 Επίδραση αφεψήματος από Χαμομήλι στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των HT29. (Α) Αξιολόγηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, (Β) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Crystal Violet. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δε χορηγήθηκε το αφέψημα και θεωρήθηκαν ότι είχαν 100% πολλαπλασιασμό, και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα, για 24, 48 και 72 h, σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL. (Γ) Σήμανση ζώντων κυττάρων με τη χρωστική Giemsa παρουσία (1 μg/μL) (δεξιά) και απουσία (αριστερά) του αφεψήματος, t=72 h, (Δ) Επίδραση του αφεψήματος στον κυτταρικό κύκλο (1 μg/μL), στον πίνακα σημειώνονται οι φάσεις του κύκλου στις οποίες υπήρξε αναστολή ($P < 0.05$), σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ η σκίαση με διαβαθμίσεις υποδηλώνει δοσοεξαρτώμενη σχέση. Οι τιμές είναι μ. όροι.±s.d τριών προσδιορισμών

Μελετώντας συνολικά τα αποτελέσματα, τα αφεψήματα βοτάνων της μελέτης κατατάσσονται κατά σειρά αυξανόμενης δραστικότητας ως προς την δυνατότητα να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HT29 ως εξής: Αντωναΐδα < Δενδρολίβανο < Φασκόμηλο < Χαμομήλι < Θυμάρι < Θρύμπα < Μαντζουράνα < Δίκταμο < Ρίγανη < Τσάι βουνού < Σπαθόχορτο < Φλισκούνι < Μελισσόχορτο.

3.4.2 Επίδραση των Αφεψημάτων στην Βιωσιμότητα και στα Επίπεδα Οξειδωτικού Στρες των Κυττάρων

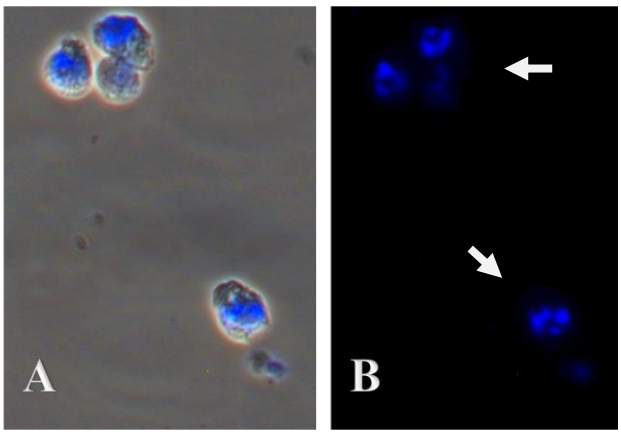
Στη παρούσα μελέτη εξετάστηκε η ικανότητα των αφεψημάτων να επάγουν την απόπτωση καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων του παχέος εντέρου και να επεμβαίνουν στην οξειδωτική τους κατάσταση.

Η ικανότητα των αφεψημάτων να επάγουν την απόπτωση των HT29 βρέθηκε να εξαρτάται (παρόμοια με τα PC3), τόσο από το είδος και τη συγκέντρωση του αφεψήματος βοτάνου, όσο και με το χρόνο που ήταν παρόν στην καλλιέργεια. Τα βότανα που βρέθηκαν ικανά να επάγουν την απόπτωση των HT29 κυττάρων παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.8 ($P < 0.05$), ενώ παραλείπονται τα βότανα που δεν προκάλεσαν κυτταρικό θάνατο δια μέσου της απόπτωσης. Με εξαίρεση τα αφεψήματα Αντωναΐδας και Δενδρολίβανου, τα υπόλοιπα έντεκα βότανα της μελέτης μείωσαν τη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων επάγοντας την απόπτωση (Εικόνα 3.31). Τα ποσοστά που καταγράφηκαν κυμάνθηκαν από 5.63-10.24 % για τις 24 h, ενώ τα ποσοστά για τις 48 h και 72 h, αντίστοιχα ήταν 4.67-40.89 % και 1.53-43.94 %. Το αφέψημα Σιδερίτη ήταν το μόνο που παρουσίασε επαγωγή της απόπτωσης σε ποσοστό μεγαλύτερο από 10 % ύστερα από 24 h. Τα αφεψήματα Δίκταμου, Θυμαριού και Ρίγανης ανέστειλαν την επιβίωση των HT29 κυρίως ύστερα από 72 h παρουσίας στην καλλιέργεια σε συγκέντρωση 1 μg/μL. Τα αντίστοιχα ποσοστά της απόπτωσης ήταν 21.45 ± 2.95, 17.87 ± 3.47 και 23.61 ± 0.41. Επαγωγή της απόπτωσης περί το 5-10 %, ύστερα από παρατεταμένη παρουσία στην καλλιέργεια σημειώθηκε και για τα αφεψήματα Μελισσόχορτου, Σπαθόχορτου, Φασκόμηλου και Χαμομηλιού. Η παρουσία του αφεψήματος Θρύμπας οδήγησε τα HT29 κύτταρα σε απόπτωση τόσο στις 48 όσο και στις 72 h. Η επίδραση του αφεψήματος ήταν δοσοεξαρτώμενη όπως φαίνεται από τα ποσοστά που σημειώθηκαν: 1.53 ± 0.30 %, 15.46 ± 2.40 και 26.61 ± 7.46, ύστερα από επώαση με 0.2, 0.6 και 1 μg/μL, αντίστοιχα. Δοσοεξαρτώμενη ήταν επίσης η επίδραση αφεψήματος από Φλισκούνι, για το οποίο καταγράφηκε και η μεγαλύτερη επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων HT29 (43.94 ± 0.52 %). Το αφέψημα Μαντζουράνας βρέθηκε επίσης πολύ δραστικό αναστέλλοντας την επιβίωση των κυττάρων > 40 % ύστερα από 48 h επώασης με 1 μg/μL.

Πίνακας 3.8 Αφεψήματα βοτάνων που παρουσίασαν στατιστικά σημαντική επαγωγή της απόπτωσης ($P < 0.05$) σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα και τα αντίστοιχα ποσοστά τους στους χρόνους και τις συγκεντρώσεις επώασης με τα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου Οι τιμές είναι μ. όροι± s.d τριών προσδιορισμών

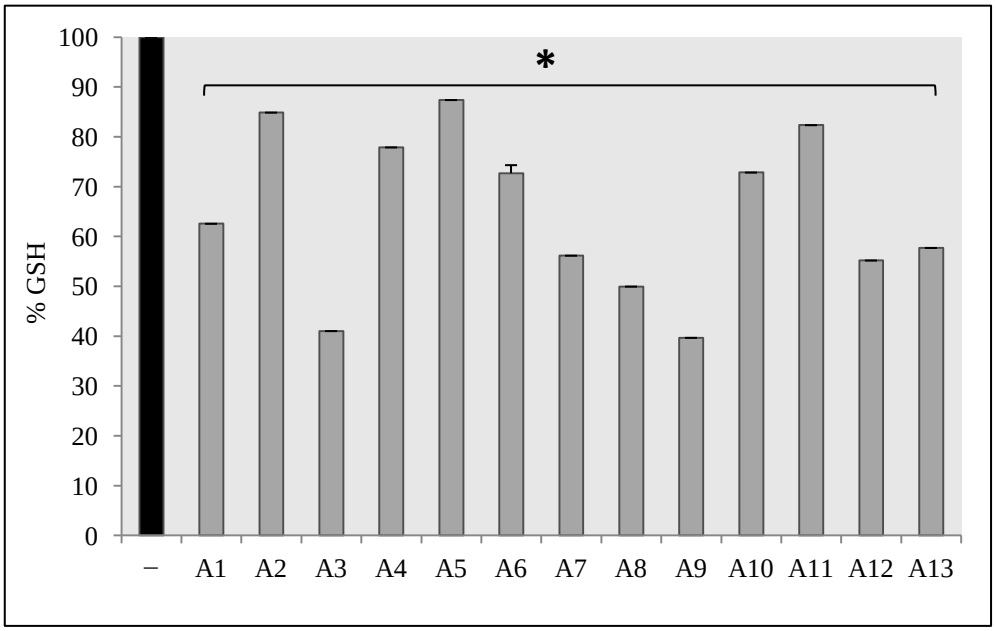
Βότανο	Συγκέντρωση (μg/μL)	Απόπτωση HT29 (%)		
		24h	48h	72h
Αρνητικός μάρτυρας	–	0.00±0.00	0.09±0.03	0.11±0.04

Βότανο	Συγκέντρωση (μg/μL)	Απόπτωση HT29 (%)		
		24h	48h	72h
(A3) Δίκταμο	0.2	–	–	–
	0.6	5.75 ± 0.87	–	–
	1	–	–	21.45 ± 2.95
(A4) Θρύμπα	0.2	–	13.18 ± 0.46	1.53 ± 0.30
	0.6	–	14.43 ± 0.19	15.46 ± 2.40
	1	–	25.25 ± 2.66	26.61 ± 7.46
(A5) Θυμάρι	0.2	–	–	–
	0.6	–	–	–
	1	–	–	17.87 ± 3.47
(A6) Μαντζουράνα	0.2	–	–	–
	0.6	–	–	12.22 ± 1.72
	1	–	40.89 ± 1.37	26.62 ± 4.77
(A7) Μελισσόχορτο	0.2	–	–	–
	0.6	–	4.67 ± 0.00	3.76± 1.09
	1		6.06 ± 1.11	7.19± 1.79
(A8) Ρίγανη	0.2	–	–	–
	0.6	–	–	–
	1	–	–	23.61 ± 0.41
(A9) Σπαθόχορτο	0.2	–	–	–
	0.6	–	–	6.99 ± 0.80
	1	5.63 ± 0.74	–	13.13 ± 0.85
(A10) Τσάι βουνού	0.2	–	–	–
	0.6	–	–	–
	1	10.24 ± 1.04	–	–
(A11) Φασκόμηλο	0.2	–	–	–
	0.6	–	–	–
	1	–	–	12.06 ± 2.43
(A12) Φλισκούνι	0.2	–	–	14.09 ± 0.48
	0.6	–	16.17 ± 2.32	16.83 ± 3.80
	1	–	–	43.94 ± 0.52
(A13) Χαμομήλι	0.2	–	–	–
	0.6	–	–	10.70 ± 2.99
	1	–	–	9.75 ± 1.77



Εικόνα 3.31 Μικροσκοπία φθορισμού των επισημασμένων με DAPI καρκινικών κυττάρων HT29. Αποπτωτικά κύτταρα καρκίνου του παχέος εντέρου ύστερα από επίδραση με το αφέψημα Μελισσόχορτου. (A) Η φθορίζουσα ουσία δεσμεύεται στο DNA με αποτέλεσμα τη σήμανσή του. Πρόκειται για συνδυασμό (επίθεση) εικόνας φθορισμού με εικόνα αντίθεσης διαφορικής συμβολής (differential interference contrast), επιτρέποντας την ταυτόχρονη παρατήρηση των κυττάρων στο ορατό φως και του πυρήνα λόγω χρώσης με το DAPI. (B) Με χρήση φίλτρου είναι δυνατή η διάκριση των ενδονουκλεοσωμικών θραυσμάτων που σχηματίζονται ως αποτέλεσμα της κατακερμάτισης του πυρηνικού DNA κατά τη διαδικασία της απόπτωσης (λευκά βέλη)

Στο Διάγραμμα 3.15 παρουσιάζεται η επίδραση των αφεψημάτων των βοτάνων στα επίπεδα της ενδοκυττάριας GSH των HT29. Η παρουσία του συνόλου των βοτάνων στην καλλιέργεια προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων της ενδοκυττάριας GSH. Πιο δραστικά βρέθηκαν τα αφεψήματα Δίκταμου, Ρίγανης και Σπαθόχορτου προκαλώντας μείωση των επιπέδων της αντιοξειδωτικής ουσίας μεγαλύτερη από 50 % (58.9, 50.0 και 60.3 % αντίστοιχα). Σημαντική μείωση προκάλεσαν επίσης τα αφεψήματα από Αντωναΐδα, Μελισσόχορτο, Φλισκούνι και Χαμομήλι. Η μείωση που σημειώθηκε κυμάνθηκε από 37.4-44.8 %. Τέλος, τα αφεψήματα Δενδρολίβανου, Θρύμπας, Θυμαριού, Μαντζουράνας, Σιδερίτη και Φασκόμηλου ήταν αυτά που επηρέασαν λιγότερο την αντιοξειδωτική άμυνα του κυττάρου. Η μείωση ήταν από 15.3 έως 27.1 %, με το Δενδρολίβανο να λαμβάνει την τελευταία θέση



*Όπου A1: Αντωναΐδα, A2: Δενδρολίβανο, A3: Δίκταμο, A4: Θρύμπα, A5: Θυμάρι, A6: Μαντζουράνα, A7: Μελισσόχορτο, A8: Ρίγανη, A9: Σπαθόχορτο, A10: Τσάι βουνού, A11: Φασκόμηλο, A12: Φλισκούνι, A13: Χαμομήλι

Διάγραμμα 3.15 Επίδραση των αφεψημάτων (0.2 μg/μL) στα επίπεδα της ενδοκυττάριας GSH (% μεταβολή) στα HT29 έπειτα από 24h επώασης. Ο (*) υποδηλώνει την ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς ($P < 0.05$) συγκριτικά με κύτταρα στα οποία δεν επέδρασε κανένας παράγοντας (- αρνητικός μάρτυρας) και για τα οποία θεωρείται ότι τα επίπεδα της GSH ήταν 100 %. Οι τιμές είναι μ. όροι ± sd τριών προσδιορισμών

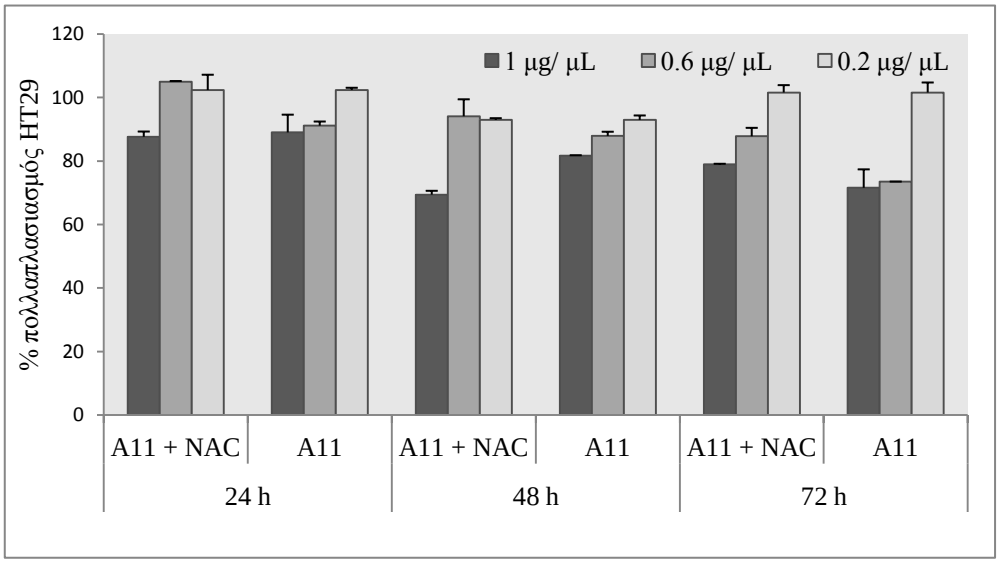
Κανένα από τα αφεψήματα των βοτάνων δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική αύξηση των ενδοκυττάριων επιπέδων των δραστικών ενώσεων οξυγόνου (Πίνακας 3.9). Επιπρόσθετα, η παρουσία NAC στην καλλιέργεια, ταυτόχρονα με τα αφεψήματα δεν προκάλεσε καμία στατιστικά σημαντική αύξηση στην βιωσιμότητα και τον αριθμό των κυττάρων, αφού για το σύνολο των αφεψημάτων η μεταβολή κυμάνθηκε από 0 έως περίπου 10 %. Στο Διάγραμμα 3.16 παρουσιάζεται ενδεικτικά η εκατοστιαία μεταβολή του πληθυσμού των επιθηλιακών κυττάρων

του παχέος εντέρου παρουσία αφεψήματος Φασκόμηλου και παρουσία NAC μαζί με το αφέψημα Φασκόμηλου.

Πίνακας 3.9 Επίπεδα φθορισμού της ουσίας DCF εντός των κυττάρων HT29 στα οποία είχαν επιδράσει τα αφεψήματα των βοτάνων. Οι τιμές είναι μ. όροι ± sd τριών προσδιορισμών

	1 μg/μL μ. όρος±sd	0.6 μg/μL μ. όρος±sd	0.2 μg/μL μ. όρος±sd
Αρνητικός μάρτυρας	40805±975	55654±2271	45366±5768
A1	38132±133	43705±2440	43977±2774
A2	38776±900	43868±2419	45250±2488
A3	38407±819	44473±1167	44485±3660
A4	40496±81	50291±4738	47388±2541
A5	38291±866	45889±3224	44376±2859
A6	39883±1453	44045±2961	41406±2159
A7	40359±661	47960±2516	42911±3325
A8	42071±1240	47019±1584	41910±1037
A9	46589±722	49897±3975	40673±1250
A10	40864±1857	45955±4642	37016±577
A11	39152±1294	43480±2213	37770±1927
A12	40367±747	51570±7894	47907±1737
A13	40192±1247	52432±2192	48974±1252

*Όπου A1: Αντωναΐδα, A2: Δενδρολίβανο, A3: Δίκταμο, A4: Θρύμπα, A5: Θυμάρι, A6: Μαντζουράνα, A7: Μελισσόχορτο, A8: Ρίγανη, A9: Σπαθόχορτο, A10: Τσάι βουνού, A11: Φασκόμηλο, A12: Φλισκούνι, A13: Χαμομήλι



Διάγραμμα 3.16 Επίδραση του αφεψήματος Φασκόμηλου (A11) ή του αφεψήματος Φασκόμηλου μαζί με NAC (A11+NAC) στον πολλαπλασιασμό HT29 καρκινικών κυττάρων έπειτα από 24, 48 και 72 h επώασης σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1 μg/μL. Οι τιμές είναι μ. όροι ± sd τριών προσδιορισμών

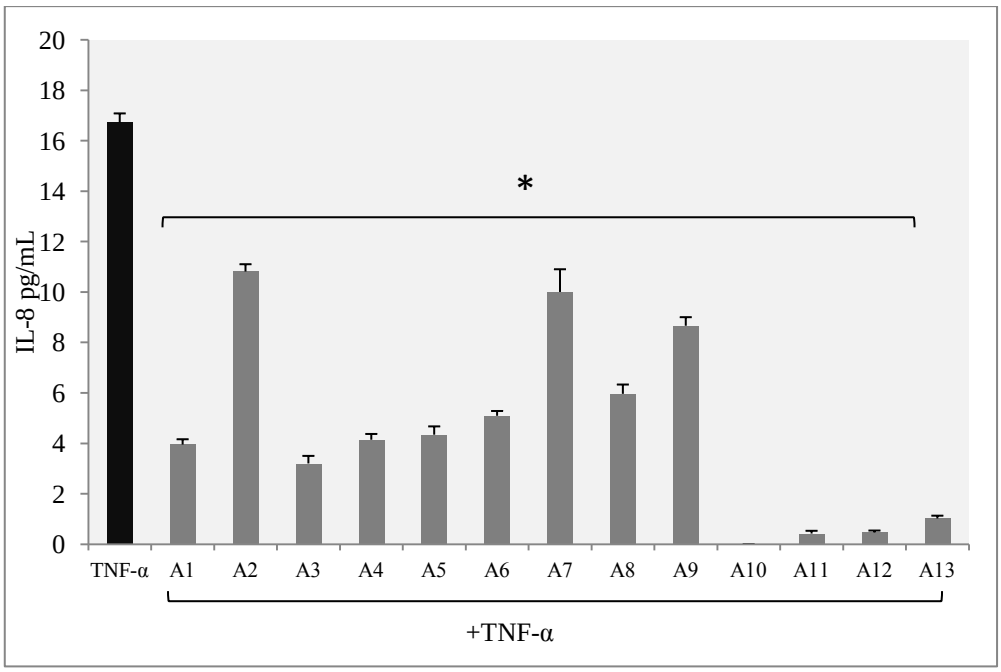
3.4.3 Επίδραση των Αφεψημάτων στα Επίπεδα Έκκρισης της Ιντερλευκίνης-8 (IL-8)

Ο ρόλος της χημειοτακτικής πρωτεΐνης IL-8 στη διαδικασία της φλεγμονώδους αντίδρασης στον καρκίνο του παχέος εντέρου έγκειται στη δράση της ως αυτοκρινούς ή/ και παρακρινούς παράγοντα ανάπτυξης. Η αυξανόμενη έκκριση και η σύνδεση στους υποδοχείς της συμβάλλει

στην εξέλιξη του όγκου, προάγοντας την επιβίωση και τη μετάσταση. Στη παρούσα μελέτη εξετάστηκε η ικανότητα των αφεψημάτων να αναστέλλουν την έκκριση της IL-8 διεγερμένων με TNF-α κυττάρων HT29.

Η προσθήκη του TNF-α σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου, οδήγησε σε επαγωγή ενός μοντέλου φλεγμονής διεγείροντας την έκκριση της IL-8 (επίπεδα αρνητικού μάρτυρα: 0.7 pg/mL, επίπεδα θετικού μάρτυρα 16.7 pg/mL). Η αύξηση ήταν στατιστικά σημαντική ($P < 0.0001$).

Στο Διάγραμμα 3.17 φαίνεται η επίδραση των αφεψημάτων στα επίπεδα έκκρισης της IL-8 διεγερμένων HT29 κυττάρων. Τα αφεψήματα στο σύνολό τους μείωσαν στατιστικά σημαντικά την έκκριση της πρωτεΐνης. Η πιο έντονη επίδραση ήταν του αφεψήματος Σιδερίτη. Τα επίπεδα έκκρισης IL-8 διεγερμένων κυττάρων ύστερα από επώαση με το αφέψημα Σιδερίτη ήταν μη μετρήσιμα με τη συγκεκριμένη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της (κάτω από τα όρια ανίχνευσης). Η παρουσία στην καλλιέργεια των αφεψημάτων από Φασκόμηλο και Φλισκούνι ανέστειλε την έκκριση της IL-8 κάτω από τα επίπεδα του αρνητικού μάρτυρα (0.42 και 0.46 pg/mL, αντίστοιχα). Επίσης έντονη ήταν η επίδραση των αφεψήματος από Χαμομήλι (1.0 pg/mL) Τα αφεψήματα Αντωναΐδας, Δίκταμου, Θρύμπας, Θυμαριού, Μαντζουράνας και Ρίγανης προκάλεσαν επίσης σημαντική μείωση των επιπέδων της IL-8 έως και 80 % (3.2-6.0 pg/mL). Τα αφεψήματα Δενδρολίβανου , Μελισσόχορτου και Σπαθόχορτου μείωσαν επίσης τα επίπεδα της πρωτεΐνης σε μικρότερο ωστόσο βαθμό από τα προαναφερθέντα. Η μείωση ήταν περί το 55 % και τα αντίστοιχα επίπεδα της IL-8 κυμάνθηκαν μεταξύ 8.7 και 11.8 pg/mL.



*Όπου Α1: Αντωναΐδα, Α2: Δενδρολίβανο, Α3: Δίκταμο, Α4: Θρύμπα, Α5: Θυμάρι, Α6: Μαντζουράνα, Α7: Μελισσόχορτο, Α8: Ρίγανη, Α9: Σπαθόχορτο, Α10: Τσάι βουνού, Α11: Φασκόμηλο, Α12: Φλισκούνι, Α13: Χαμομήλι

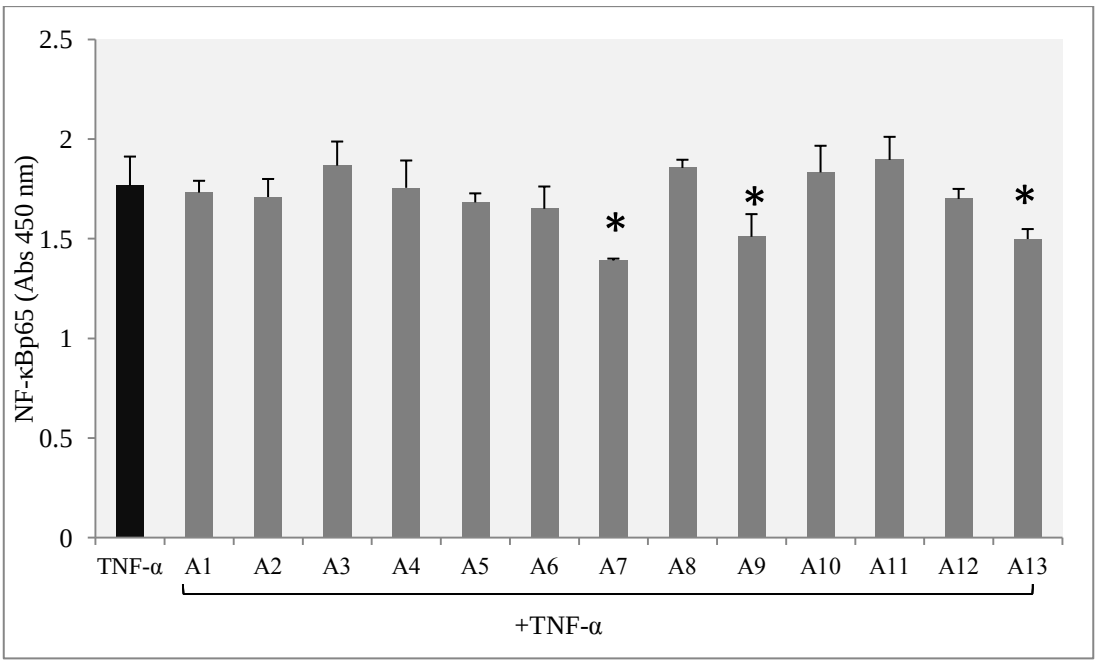
Διάγραμμα 3.17 Επίδραση αφεψημάτων στα επίπεδα έκκρισης της IL-8 σε διεγερμένα HT29 έπειτα από 24 h επώασης. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.0001$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία είχε επιδράσει ο TNF-α (θετικός μάρτυρας) και εκείνων στα οποία είχαν επιδράσει τα αφεψήματα βοτάνων. Οι τιμές είναι μ. όροι ± sd τριών προσδιορισμών

3.4.4 Επίδραση των Αφεψημάτων στα Επίπεδα του Πυρηνικού Παράγοντα-κΒ (NF-κΒ) p65

Στη παρούσα μελέτη εξετάστηκε επίσης η ικανότητα των αφεψημάτων να αναστέλλουν τα επίπεδα ενεργοποίησης του NF-κΒp65 διεγερμένων με TNF-α κυττάρων HT29.

Η προσθήκη του TNF-α, διέγειρε τα επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του NF-κΒ (10 φορές υψηλότερα επίπεδα ενεργοποίησης). Η θετική μεταβολή που παρατηρήθηκε στην απορρόφηση ήταν στατιστικά σημαντική ($P < 0.0001$).

Στο Διάγραμμα 3.18 φαίνεται η επίδραση των αφεψημάτων στα επίπεδα ενεργοποίησης του NF-κΒp65 διεγερμένων κυττάρων HT29. Η επώαση των κυττάρων με τα αφεψήματα δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων του μεταγραφικού παράγοντα, με εξαίρεση τα αφεψήματα Μελισσόχορτου, Σπαθόχορτου και Χαμομηλιού τα οποία προκάλεσαν μείωση της τάξης του 21, 15 και 15 %, αντίστοιχα.



*Όπου A1: Αντωναΐδα, A2: Δενδρολίβανο, A3: Δίκταμο, A4: Θρύμπα, A5: Θυμάρι, A6: Μαντζουράνα, A7: Μελισσόχορτο, A8: Ρίγανη, A9: Σπαθόχορτο, A10: Τσάι βουνού, A11: Φασκόμηλο, A12: Φλισκούνι, A13: Χαμομήλι

Διάγραμμα 3.18 Επίδραση αφεψημάτων στα επίπεδα ενεργοποίησης του NF-κBp65 σε διεγερμένα HT29 έπειτα από 24 h επώασης. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.0001$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία είχε επιδράσει ο TNF-α (θετικός μάρτυρας) και εκείνων στα οποία είχαν επιδράσει τα αφεψήματα βοτάνων. Οι τιμές είναι μ. όροι ± sd τριών προσδιορισμών

3.4.5 Συσχέτιση Χημειοπροστατευτικής Δράσης των Αφεψημάτων στα HT29 με το Φαινολικό τους Περιεχόμενο

Η ικανότητα των αφεψημάτων να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου συσχετίσθηκε με την παρουσία του *p*-κουμαρικού οξέος (R=0.739, $P < 0.01$). Η αντιφλεγμονώδης δράσης των αφεψημάτων έναντι των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου που σημειώθηκε μέσω μείωσης των επιπέδων ενεργοποίησης του NF-κB συσχετίσθηκε με τα υδροξυ-κινναμωμικά οξέα, παρουσιάζοντας βαθμό συσχέτισης R=0.726 ($P < 0.01$). Συγκεκριμένα, καταγράφηκε βαθμός συσχέτισης R=0.765 ($P < 0.01$) με το 3-4 διυδροξυφαινυλοξικό οξύ, R=0.721 ($P < 0.01$) με το ροσμαρινικό οξύ και R=0.618 ($P < 0.05$) με το ολεανολικό οξύ.

ΚΕΦΆΛΑΙΟ IV : ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

4.1 Συζήτηση

Τα τελευταία χρόνια η ύπαρξη πλήθους μελετών, που συσχετίζουν διατροφικούς παράγοντες με χρόνιες εκφυλιστικές νόσους, οδηγεί τους επιστήμονες στη διερεύνηση διατροφικών προτύπων, βέλτιστων για τη διατήρηση της υγείας. Σήμερα είναι επιβεβαιωμένο ότι διατροφικά πρότυπα, όπως η Μεσογειακού τύπου Διατροφή, είναι σε θέση να τροποποιήσουν τον κίνδυνο εμφάνισης νοσημάτων, τόσο σε πρωτοβάθμιο όσο και σε δευτεροβάθμιο επίπεδο πρόληψης. Ειδικότερα, οι ευεργετικές δράσεις για την υγεία που αποδίδονται στην υιοθέτηση του Μεσογειακού διατροφικού προτύπου συσχετίζονται με τα συστατικά του, η κατανάλωση των οποίων με βάση τη συγκεκριμένη συχνότητα η οποία συστήνεται για καθένα από αυτά, οδηγεί σε αυξημένη πρόσληψη φυτικών ινών, βιταμινών και φυτοχημικών καθώς και αυξημένο λόγο ακόρεστων έναντι κορεσμένων λιπαρών οξέων (Martínez-González *et al.*, 2012).

Όσον αφορά στα φυτοχημικά, πρόκειται για βιοδραστικές χημικές ενώσεις που απαντούν στα φυτά ως δευτερογενείς μεταβολίτες. Η διατροφική τους πρόσληψη έχει συσχετισθεί με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης χρόνιων ασθενειών όπως είναι τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ο σακχαρώδης διαβήτης, διάφορες μορφές καρκίνου κ.α. (Gordon, 1996; Lee *et al.*, 2011b; Pérez-Jiménez *et al.*, 2010). Από τις τάξεις των φυτοχημικών συστατικών, οι πολυφαινόλες έχουν μελετηθεί εκτενώς. Πρόκειται για μια μεγάλη ομάδα ετερογενών ενώσεων οι οποίες επιδεικνύουν αντιοξειδωτική δράση, δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες ή/και ενισχύοντας την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού, καθώς και αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακή και χημειοπροστατευτική δράση (Ahmed *et al.*, 2015; Pradeep and Sreerama, 2015; Velderrain-Rodríguez *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015a).

Τα βότανα είναι βασικά συστατικά της Μεσογειακής Διατροφής και αποτελούν πηγή φυτοχημικών συστατικών. Διατροφικά, συνιστάται η καθημερινή πρόσληψή τους λόγω των ευεργετικών δράσεων και της μειωμένης τοξικότητας που παρουσιάζουν. Η παρούσα μελέτη επιχειρεί για πρώτη φορά την αξιολόγηση του φυτοχημικού περιεχομένου και της βιολογικής δράσης των αφεψημάτων δεκατριών βοτάνων, ορισμένων ενδημικών του Ελλαδικού χώρου.

Για τη διατροφική αξιολόγηση των αφεψημάτων ως συστατικών της Μεσογειακής Διατροφής, εφαρμόστηκε αρχικά η παραδοσιακή μέθοδος παρασκευής τους όπως περιγράφηκε από τους Liolios και συνεργάτες (Liolios *et al.*, 2010). Ακολούθως, εφαρμόστηκε η διαδικασία της λυοφιλίωσης για την παραλαβή του στερεού υπολείμματος των αφεψημάτων. Η εφαρμογή της συγκεκριμένης διαδικασίας αφυδάτωσης έγκειται στην αποτελεσματικότητά της στη διατήρηση του φαινολικού περιεχομένου των αφεψημάτων (Abascal *et al.*, 2005). Η απόδοση σε

στερεό υπόλειμμα διέφερε σημαντικά μεταξύ των αφεψημάτων καθώς κυμάνθηκε μεταξύ 72.7-904.3 mg/κούπα (κούπα=200 mL) (Πίνακας 3.1). Το Δενδρολίβανο απέδωσε τη χαμηλότερη ποσότητα στερεού υπολείμματος, ενώ την υψηλότερη το Μελισσόχορτο. Είναι γνωστό ότι, πέρα από την περιεκτικότητα του βοτάνου σε βιοδραστικά συστατικά, ο τρόπος συλλογής και αποθήκευσης αλλά και η φύση του ίδιου του φυτού επηρεάζουν την απόδοση σε στερεό υπόλειμμα (Naczk and Shahidi, 2006). Πιθανώς η μορφολογία των φύλλων του Δενδρολίβανου (σκληρά, δερματώδη, βελονοειδή φύλλα) είναι η αιτία για τη μικρή απόδοση σε στερεό υπόλειμμα του παρουσίασε το συγκεκριμένο αφέψημα. Στη συνέχεια, με σκοπό τον ποσοτικό προσδιορισμό των ολικών φαινολικών συστατικών των αφεψημάτων εφαρμόστηκε η μέθοδος Folin-Ciocalteu. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 3.1, το αφέψημα Μελισσόχορτου εμφάνισε την υψηλότερη περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις (341.9±28.2 mg GAE/κούπα), ακολουθούμενο από το αφέψημα Σπαθόχορτου (152.8±1.7 mg GAE/κούπα). Τελευταίο στην κατάταξη ήταν το αφέψημα Δενδρολίβανου το οποίο περιείχε 8.5±0.1 mg GAE/κούπα. Η υψηλή απόδοση του Μελισσόχορτου έναντι άλλων αφεψημάτων έχει αναφερθεί και βιβλιογραφικά (Fecka and Turek, 2007; Ivanova *et al.*, 2005; Katalinic *et al.*, 2006), ωστόσο η σύγκριση των αποτελεσμάτων με τα αντίστοιχα της σύγχρονης βιβλιογραφίας, είναι δύσκολη και ίσως μάταια. Στην παρούσα μελέτη, όπως ήταν αναμενόμενο, το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο των αφεψημάτων συσχετίστηκε ισχυρά με το στερεό υπόλειμμα (R=0.812, $P < 0.001$). Οι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την απόδοση σε στερεό υπόλειμμα και κατ' επέκταση το περιεχόμενο φυτοχημικών είναι το είδος του διαλύτη, ο χρόνος εκχύλισης, η θερμοκρασία και η αναλογία στερεού/υγρό (Arceusz and Wesolowski, 2013; Kratchanova *et al.*, 2010). Η επιλογή του διαλύτη διαδραματίζει επίσης κρίσιμο ρόλο και στην παραλαβή των φαινολικών συστατικών (Kratchanova *et al.*, 2010; Naczk and Shahidi, 2006). Οι διαλύτες που βρίσκουν συνήθως εφαρμογή στην παραλαβή των βιοδραστικών συστατικών των βοτάνων είναι η μεθανόλη (Shan *et al.*, 2005; Wojdyło *et al.*, 2007), η αιθανόλη (Djeridane *et al.*, 2006) και το νερό (Atoui *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007; Ivanova *et al.*, 2005; Katalinic *et al.*, 2006; Kiselova *et al.*, 2006; Skotti *et al.*, 2014; Zheng and Wang, 2001). Αναφορικά με τη βέλτιστη απόδοση σε φαινολικά συστατικά, η μεθανόλη ως μέσο εκχύλισης χαρακτηρίζεται από μεγάλη πολικότητα, μικρότερη ωστόσο από την αντίστοιχη του νερού, με αποτέλεσμα την παραλαβή περισσοτέρων ουσιών (Yoo *et al.*, 2008). Η συγκριτική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας με τα αντίστοιχα άλλων ερευνητικών ομάδων παραμένει δύσκολη ακόμα και όταν ως μέσο εκχύλισης εφαρμόζεται ο ίδιος διαλύτης. Αυτό οφείλεται στην ετερογένεια των βιοδραστικών συστατικών μεταξύ των βοτάνων ακόμα και του ίδιου είδους ως αποτέλεσμα διαφορετικών γεωγραφικών και περιβαλλοντικών συνθηκών και άλλων παραγόντων που επιδρούν κατά την ανάπτυξη του

βοτάνου (Herrera-Carrera *et al.*, 2015). Επίσης, ο τρόπος παραλαβής των συστατικών από τα αφεψήματα επηρεάζει το συνολικό φαινολικό περιεχόμενό τους. Συγκεκριμένα, στην μελέτη των Atoui και συνεργατών, στην οποία εφαρμόστηκε η ίδια μέθοδος παρασκευής αφεψημάτων από Ελληνικά βότανα, χρησιμοποιήθηκε οξικός αιθυλεστέρας για την παραλαβή των φαινολικών συστατικών από τα αφεψήματα. (Atoui *et al.*, 2005).

Η σχέση δομής-δράσης που παρουσιάζουν τα φυτοχημικά είναι επιβεβαιωμένη και γι' αυτό κρίθηκε απαραίτητος ο προσδιορισμός των φαινολικών και των τερπενοειδών συστατικών των αφεψημάτων. Για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των φυτοχημικών συστατικών εφαρμόσθηκε ένα φωτομετρικό τεστ και χρησιμοποιήθηκαν δυο χρωματογραφικές τεχνικές. Από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι τα αφεψημάτων των βοτάνων της μελέτης χαρακτηρίζονται από διαφορετικό προφίλ φαινολικών και τερπενικών δομών (Πίνακες 3.2, 3.3 και 3.4). Από τον ποσοτικό προσδιορισμό των συστατικών που απαντούν στα αφεψήματα βρέθηκε ότι κυρίαρχα συστατικά ήταν το ροσμαρινικό οξύ (υδροξυ-κινναμωμικό οξύ) και η τερπενοειδής φαινόλη καρβακρόλη. Το ροσμαρινικό οξύ προσδιορίσθηκε σε 11 από τα 13 αφεψήματα της μελέτης αποτελώντας ταυτόχρονα το κυριότερο φαινολικό συστατικό στο αφέψημα Μελισσόχορτου. Το παραπάνω ήταν αναμενόμενο καθώς το ροσμαρινικό οξύ απαντά στην πλειοψηφία των βοτάνων της οικογένειας Lamiaceae (Trivellini *et al.*, 2016). Η παρουσία του ήταν σημαντική καθώς επιδεικνύει πλήθος βιολογικών δράσεων όπως αντιοξειδωτική, αντιβακτηριδιακή, αντιιική, χημειοπροστατευτική, αντιαθηρογόνο, αντιδιαβητική, νευροπροστατευτική κ.α. (Kim *et al.*, 2015; Vladimir-Knezevic *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2014). Τα αφεψήματα επίσης χαρακτηρίστηκαν από την παρουσία καφεϊκού οξέος και παραγώγων του, τα οποία προσδιορίστηκαν σε σημαντικές ποσότητες στα αφεψήματα Ρίγανης και Χαμομηλιού. Η παρουσία χλωρογενικών οξέων σε εκχυλίσματα βοτάνων επιβεβαιώνεται και βιβλιογραφικά (Askun *et al.*, 2013; Wojdyło *et al.*, 2007; Zgórka and Glowniak, 2001), ενώ η σημασία τους έγκειται στην ικανότητά τους να επιδεικνύουν αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, χημειοπροστατευτική και αντιβακτηριδιακή δράση (Berdowska *et al.*, 2013; Gülçin, 2006; Generalić Mekinić *et al.*, 2014; Sato *et al.*, 2011). Σημαντική κρίνεται επίσης η παρουσία φλαβονοειδών στο σύνολο των αφεψημάτων κυρίως λόγω της ικανότητάς στους να δρουν ως αντιοξειδωτικές, χημειοπροστατευτικές, καρδιοπροστατευτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιμικροβιακές ουσίες (Berdowska *et al.*, 2013; Ishizawa *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011a; Ramos, 2008; Rao *et al.*, 2012). Όπως επιβεβαιώθηκε στο σύνολο των δοκιμών που εφαρμόστηκαν, αλλά και βιβλιογραφικά (Sentkowska *et al.*, 2016), το αφέψημα Σπαθόχορτου περιείχε τη μεγαλύτερη ποσότητα φλαβονοειδών με κύριους εκπρόσωπους την κατεχίνη και την κερκετίνη. Επιπρόσθετα, η μεγάλη πολικότητα του νερού επέτρεψε την παραλαβή γλυκοζυλιωμένων και

μεθυλιωμένων παραγώγων των φλαβονοειδών, κυρίως της απιγενίνης, της λουτεολίνης αλλά και παραγώγων φαινολικών οξέων. Αν και η παρουσία τους κρίθηκε σημαντική, καθώς παρουσιάζουν τις δράσεις των αντίστοιχων ελεύθερων μορίων τους, οι συζευγμένες πολυφαινόλες φαίνεται να επιδεικνύουν συγκριτικά μειωμένη δραστικότητα (Williams *et al.*, 2004). Τα τερπενοειδή είναι επίσης μια μεγάλη κατηγορία ενώσεων που απαντούν κυρίως στα λιπόφιλα μέρη των βοτάνων, όπως είναι οι ελαιαδένες. Οι μονοτερπενικές αλκοόλες θυμόλη και καρβακρόλη εντοπίστηκαν σχεδόν στο σύνολο των αφεψημάτων των βοτάνων, ειδικότερα όμως στα αφεψήματα Θυμαριού και Ρίγανης, αντίστοιχα. Τα τριτερπενικά οξέα ολεανολικό και ουρσολικό οξύ ανιχνεύθηκαν σε αξιόλογες συγκεντρώσεις στα αφεψήματα, ιδίως στο Φασκόμηλο, ενώ πλήθος άλλων μονοτερπενικών συστατικών ανιχνεύτηκαν στο λιπόφιλο κλάσμα των αφεψημάτων που απομονώθηκε με με εκχύλιση με διαιθυλαιθέρα, όπως η ευκαλυπτόλη, η βορνεόλη, η τερπινεόλη, η ευγενόλη κ.α (Πίνακες 3.4Α και 3.4Β). Ωστόσο σημαντική ήταν η μη ανίχνευση καρνοσόλης και καρνοσικού οξέος από το αφέψημα Δενδρολίβανου , πιθανότατα λόγω της χρήσης του νερού ως μέσου εκχύλισης έναντι οργανικών διαλυτών που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση και προσδιορισμό τους στη βιβλιογραφία (Bendif *et al.*, 2017; Borrás-Linares *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2016; Okamura *et al.*, 1994) και η παρουσία της μονοτερπενικής κετόνης, θουγιανόνης στο αφέψημα Φασκόμηλου, η οποία σε υψηλές συγκεντρώσεις παρουσιάζει τοξική δράση (Sotiropoulou *et al.*, 2016). Όσον αφορά στις τερπενικές δομές, η βιβλιογραφία αναφέρει σημαντικές δράσεις όπως αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή, αντιφλεγμονώδη, χημειοπροστατευτική, αντιδιαβητική κ.α. (Bassolé and Juliani, 2012; Kalogeropoulos and Tsimidou, 2014; Mechergui *et al.*, 2010; Okoye *et al.*, 2014; Sánchez-Quesada *et al.*, 2013).

Η αντιοξειδωτική δράση είναι ίσως από τις πιο σημαντικές ιδιότητες που παρουσιάζουν τα φυτοχημικά, καθώς είναι αλληλένδετη με το σύνολο των δράσεων που επιδεικνύουν. Το οξειδωτικό στρες, δηλαδή η ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών παραγόντων, προς όφελος των πρώτων (Sies, 1997), αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα μιας ετερογενούς ομάδας νοσημάτων (Juránek *et al.*, 2013), όπως η αθηροσκλήρωση, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η καρκινογένεσης και οι επιπλοκές που σχετίζονται με το σακχαρώδη διαβήτη (Halliwell, 2007b; Jaeschke, 2011; Reed, 2011). Η αντιοξειδωτική δράση των φυτοχημικών εκφράζεται από τα φυτοχημικά μέσω της ικανότητας δέσμευσης ελευθέρων ριζών, της αναγωγής οξειδωμένων μορίων και της σύμπλεξης ιόντων μετάλλων (Mira *et al.*, 2002; Rice-Evans *et al.*, 1996), διακόπτοντας τις αλυσιδωτές αντιδράσεις οξείδωσης προτού φανούν επιβλαβείς για ζωτικής σημασίας βιομόρια (Oroian and Escriche, 2015). Στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκε η αντιοξειδωτική δράση των αφεψημάτων ελέγχοντας και τους τρεις προαναφερθέντες

μηχανισμούς. Για την εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης ελευθέρων ριζών χρησιμοποιήθηκε η ρίζα DPPH$^{\bullet}$. Η χρήση της συγκεκριμένης μεθόδου βρίσκει ευρεία εφαρμογή στην αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας αφεψημάτων καθώς δεν έχει ακόμα οριστεί πρότυπη μέθοδος γι' αυτή την ανάλυση (Skotti *et al.*, 2014). Η αναγωγική ικανότητα των αφεψημάτων αξιολογήθηκε με τη μέτρηση της ικανότητας αναγωγής ιόντων Fe^{+++} (μέθοδος FRAP). Όπως παρουσιάζεται στα Διαγράμματα 3.2 και 3.3, τα αφεψήματα παρουσιάζουν σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα με τη σειρά κατάταξης να έχει ως εξής: Μελισσόχορτο > Σπαθόχορτο > Ρίγανη > Φλισκούνι > Μαντζουράνα > Δίκταμο > Θρύμπα > Χαμομήλι > Θυμάρι > Τσάι βουνού > Αντωναΐδα > Φασκόμηλο > Δενδρολίβανο. Η σειρά δραστικότητας επιβεβαιώνεται βιβλιογραφικά από ερευνητικές ομάδες που προσδιόρισαν την αντιοξειδωτική ικανότητα επιλεγμένων αφεψημάτων βοτάνων (Atoui *et al.*, 2005; Kulisic *et al.*, 2007). Η μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δραστικότητα του αφεψήματος Μελισσόχορτου έναντι αυτού της Ρίγανης έχει επίσης αναφερθεί (Skotti *et al.*, 2014) και έχει αποδοθεί στην παρουσία του ροσμαρινικού οξέος και της καρβακρόλης (Albano and Miguel, 2011; Capecka *et al.*, 2005; Mechergui *et al.*, 2010). Περαιτέρω, από τη συσχέτιση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τον ποσοτικό προσδιορισμό του προφίλ των φυτοχημικών και των αντιοξειδωτικών δοκιμών επιβεβαιώνεται η υπόθεση ότι η αντιοξειδωτική δράση των αφεψημάτων αποδίδεται στα φαινολικά και τερπενικά συστατικά τους. Συγκεκριμένα, η αναγωγική δύναμη εμφάνισε συντελεστή συσχέτισης R=0.908 ($P < 0.001$) με το σύνολο των πολυφαινολών και ειδικότερα με το ροσμαρινικό (R=0.949, $P < 0.001$) και το καφεϊκό οξύ (R=0.737, $P < 0.01$) καθώς και με το τερπενικό οξύ, ολεανολικό οξύ (R=0.829, $P < 0.001$). Αντίστοιχα, η ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών παρουσίασε επίσης υψηλό βαθμό συσχέτισης R=0.931 ($P < 0.001$) με το φαινολικό περιεχόμενο των αφεψημάτων, ειδικότερα με το καφεϊκό οξύ και το 3-4 διυδροξυφαινυλοξικό οξύ (R=0.610, $P < 0.05$ και R=0.662, $P < 0.05$, αντίστοιχα) και με τα φλαβονοειδή (R=0.581, $P < 0.01$) επικατεχίνη, κατεχίνη και κερκετίνη (R=0.584, $P < 0.05$, R=0.581, $P < 0.05$ και R=0.579, $P < 0.05$, αντίστοιχα). Ο βαθμός υδροξυλίωσης καθώς και η θέση των OH- ομάδων φαίνεται να σχετίζεται με την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση που παρουσιάζουν οι παραπάνω ενώσεις (Rice-Evans *et al.*, 1996). Η θετική συσχέτιση της αντιοξειδωτικής ικανότητας και του φαινολικού περιεχομένου τονίζεται από ένα σύνολο ερευνητικών ομάδων (Cai *et al.*, 2006; Canadanovic-Brunet *et al.*, 2008; Dorman *et al.*, 2004; Katalinic *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008; Shan *et al.*, 2005), ενώ υπάρχουν και μελέτες στις οποίες αυτή η σχέση δεν παρατηρήθηκε (Li *et al.*, 2013; Stagos *et al.*, 2012) ή αντίθετα σημειώθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ της αντιοξειδωτικής ικανότητας και του φαινολικού περιεχομένου (Kähkönen *et al.*, 1999).

Στην παρούσα μελέτη τα αφεψήματα των βοτάνων εκτιμήθηκαν αναφορικά με την ικανότητά τους να συμπλέκουν τα δισθενή κατιόντα των μετάλλων χαλκού (Cu) και σιδήρου (Fe) επηρεάζοντας με αυτό τον τρόπο τη βιοδιαθεσιμότητά τους. Η σημασία ελέγχου της αντιοξειδωτικής ικανότητας των αφεψημάτων ως δεσμευτών μετάλλων είναι μεγάλη καθώς μέταλλα όπως ο σίδηρος (Fe), ο χαλκός (Cu), το χρώμιο (Cr) και το κοβάλτιο (Co) συμβάλλουν στην παραγωγή οξειδωτικών μορίων (Karavoltsos *et al.*, 2014), ενώ ορισμένα αποτελούν συμπαράγοντες μεταλλοπρωτεϊνασών που εμπλέκονται στη νόσο του Alzheimer (Bush and Tanzi, 2008). Από τα αποτελέσματα του Διαγράμματος 3.5, προκύπτει ότι τα αφεψήματα των βοτάνων της μελέτης είναι ικανά να συμπλέξουν τόσο το Cu όσο και το Fe επιδεικνύοντας διαφορετική δραστικότητα, ανάλογα με το είδος του μετάλλου. Βιβλιογραφικά έχει αναφερθεί ότι το αφέψημα πράσινου Τεΐου είναι ικανό να συμπλέκει και τα δυο αυτά μέταλλα (Rodrigues *et al.*, 2016) και ότι η συμπλεκτική ικανότητα των πολυφαινολών σχετίζεται με τον αριθμό και τη θέση των ομάδων OH (Andjelković *et al.*, 2006; Khokhar and Apenten, 2003). Στην παρούσα μελέτη τα αποτελέσματα της συμπλεκτικής ικανότητας Fe και Cu δε φάνηκε να συσχετίζονται με το σύνολο των φαινολικών ενώσεων που απαντούν στα αφεψήματα, αλλά μόνο με συγκεκριμένες ενώσεις όπως το συριγγικό οξύ, το *p*-υδροξυφαινυλοξικό οξύ, το *o*-κουμαρικό οξύ και το σιναπικό οξύ (R=0.610, R=0.713, R=0.593 και R=0.886, αντίστοιχα $P < 0.05$), οι οποίες αποτέλεσαν ικανούς δεσμευτές μόνο του χαλκού. Η έλλειψη συσχέτισης μεταξύ της συμπλεκτικής ικανότητας μετάλλων και του συνολικού φαινολικού περιεχομένου έχει αναφερθεί και από άλλες ερευνητικές ομάδες που μελέτησαν αφεψήματα ή εκχυλίσματα βοτάνων ή διαφορετικές κατηγορίες τροφίμων, καταδεικνύοντας άλλες κατηγορίες ενώσεων ως παράγοντες σύμπλεξης (Kalogeropoulos *et al.*, 2013; Sánchez-Vioque *et al.*, 2013; Wong *et al.*, 2006). Αναφορικά με τα αφεψήματα της παρούσας μελέτης, οι Karavoltsos και συνεργάτες έπειτα από ανάλυση των κρίσιμων συστατικών (PCA) των αφεψημάτων προσδιόρισαν ενώσεις, όπως υδατάνθρακες και καταλυτικά ενεργές ενώσεις ως ικανούς δεσμευτές του χαλκού, ταυτόχρονα με τα υδροξυ-κινναμωμικά οξέα (εκτός του ροσμαρινικού οξέος), τις τερπενοειδείς φαινόλες και τις φλαβόνες (Karavoltsos *et al.*, 2014).

Το σύνολο των πειραματικών διαδικασιών που περιγράφονται παραπάνω επέτρεψαν το χαρακτηρισμό των αφεψημάτων των βοτάνων ως τροφίμων με υψηλή αντιοξειδωτική δραστικότητα. Ωστόσο στο σύνολό τους αφορούν *in vitro* πειραματικές δοκιμές, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την έλλειψη βιοδεικτών όπως π.χ. κυττάρων ή βιομορίων. Στην παρούσα μελέτη η αντιοξειδωτική δράση των αφεψημάτων αξιολογήθηκε, επίσης, μέσω της ικανότητάς τους να αναστέλλουν την *in vitro* οξειδωτική τροποποίηση των λιποπρωτεϊνών του ορού

παρουσία χαλκού. Η μέθοδος βρίσκει ευρεία εφαρμογή στην αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής δράσης υδατικών και οργανικών εκχυλισμάτων βοτάνων (Abd El-Hady and El-Shahid, 2014; Cazzola *et al.*, 2011; Jin and Cho, 2011; Kulisic *et al.*, 2007), φαινολικών συστατικών (Ha *et al.*, 2014; Prieto *et al.*, 2007) και άλλων δειγμάτων (Anastasiadi *et al.*, 2010; Kaliora *et al.*, 2015), προσομοιώνοντας εν μέρει τις *in vivo* διαδικασίες οξείδωσης. Η *in vivo* οξειδωτική τροποποίηση της LDL στο αγγειακό ενδοθηλιακό τοίχωμα, αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα για την έναρξη και εξέλιξη της αθηρωματικής διαδικασίας (Berliner and Heinecke, 1996). Συνεπώς, τα φυτοχημικά μπορούν να δράσουν ως αντιαθηρογόνοι παράγοντες αναστέλλοντας τις διαδικασίες οξείδωσης της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (Scalbert *et al.*, 2005). Όπως παρουσιάζεται στα Διαγράμματα 3.6Α και 3.6Β, τα αφεψήματα των βοτάνων ανέστειλαν την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών του ορού με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Την πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση επέδειξαν τα αφεψήματα Ρίγανης, Μελισσόχορτου, Θρύμπας και Δίκταμου επιβραδύνοντας τη διαδικασία οξείδωσης περισσότερο από 5.5 h στη συγκέντρωση 1 μg/μL. Η δράση τους δε συσχετίσθηκε με το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο, ωστόσο συσχετίσθηκε στατιστικώς σημαντικά με το υδροξυ-κινναμωμικό καφεϊκό οξύ και την τερπενοειδής φαινόλη καρβακρόλη (R=0.603 και R=0.663, αντίστοιχα $P < 0.05$). Στη μελέτη των Kulisic και συνεργατών, η αντιοξειδωτική δράση αφεψημάτων και εκχυλισμάτων Ρίγανης και Θυμαριού στην αναστολή της από χαλκό επαγόμενης οξείδωσης της LDL αποδόθηκε επίσης στην καρβακρόλη και σε άλλα μονοτερπένια αλλά και στην παρουσία ροσμαρινικού οξέος (Kulisic *et al.*, 2007). Η ισχυρή αντιοξειδωτική δράση των τερπενοειδών φαινολών επιβεβαιώνεται και στη μελέτη των Teissedre και συνεργατών, οι οποίοι κατέγραψαν επίσης, σε αντίθεση με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, συσχέτιση μεταξύ του ολικού φαινολικού περιεχομένου των δειγμάτων με την αντιοξειδωτικής τους δράση έναντι της οξείδωσης της LDL (Teissedre and Waterhouse, 2000).

Η αθηροσκλήρωση είναι η κύρια αιτία καρδιαγγειακών νοσημάτων τα οποία χαρακτηρίζονται από μεγάλη θνησιμότητα (1/3 θανάτων σε παγκόσμιο επίπεδο) (WHO, 2016). Αιτιολογικοί παράγοντες κινδύνου για την έναρξη και εξέλιξη της αθηρωματικής διαδικασίας είναι το οξειδωτικό στρες και η μικρής έντασης χρόνια αγγειακή φλεγμονή (Moss and Ramji, 2016; Siti *et al.*, 2015). Η μακροχρόνια φλεγμονώδης διαδικασία χαρακτηρίζεται από ενεργοποίηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, πολλαπλασιασμό των αγγειακών κυττάρων και ιστική βλάβη (Leyva-López *et al.*, 2016). Κατά την έναρξη της αθηρωμάτωσης, τα ενδοθηλιακά κύτταρα ενεργοποιούνται από τις κυτταροκίνες IFN-γ και TNF-α συνεπάγοντας μορφολογικές αλλαγές και δημιουργία «κενών» μεταξύ των συνάψεων γειτονικών κυττάρων

αυξάνοντας τη διαπερατότητα του ενδοθηλίου για την LDL. Η μετατροπή της LDL στο οξειδωμένο της παράγωγο, oxLDL, διεγείρει περισσότερο τα ενδοθηλιακά κύτταρα για την παραγωγή κυτταροκινών και χημειοκινών, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση και στρατολόγηση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (Ramji and Davies, 2015). Τα διεγερμένα μονοκύτταρα που συσσωρεύονται στην περιοχή της βλάβης εκκρίνουν αρχικά τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες TNF-α και IL-1β, γεγονός που οδηγεί στην έκκριση της IL-6 και της MCP-1 (Leyva-López *et al.*, 2016; Moss and Ramji, 2016). Συνεπώς, λόγω της αυξημένης συμμετοχής των κυτταρακινών στην έναρξη και εξέλιξη της αθηρωμάτωσης, ακόμα και στη σταθερότητα της αθηρωματικής πλάκας, οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν μόρια-«στόχους» θεραπευτικών προσεγγίσεων. Στην προσπάθεια περαιτέρω ανάδειξης της αντιαθηρογόνου ικανότητας των αφεψημάτων εκτιμήθηκαν τα επίπεδα των εκκρινόμενων TNF-α, IL-6 και MCP-1 από διεγερμένα με LPS μονοπύρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος, παρουσία ή απουσία αφεψημάτων. Είναι φανερό ότι τα αφεψήματα της μελέτης προκαλούν ανοσολογικές μεταβολές στα PBMCs (Διαγράμματα 3.7, 3.8 και 3.9). Η ικανότητα ορισμένων από τα βότανα της μελέτης να αναστέλλουν την έκκριση των κυτταροκινών TNF-α και IL-6 και της χημειοκίνης MCP-1 έχει επιβεβαιωθεί από προηγούμενες μελέτες (Arranz *et al.*, 2015; Mueller *et al.*, 2010; Ocaña-Fuentes *et al.*, 2010). Η παρατηρούμενη αναστολή της έκκρισης των προφλεγμονωδών κυτταροκινών θεωρήθηκε αρχικά ότι ήταν το αποτέλεσμα της αντιοξειδωτικής δύναμης των αφεψημάτων. Ωστόσο, η αντιοξειδωτική ικανότητα των αφεψημάτων δε συσχετίσθηκε με την ικανότητά τους να αναστέλλουν την έκκριση των TNF-α, IL-6 και MCP-1. Πιθανώς, η μειωμένη έκκριση των προφλεγμονωδών μορίων να σχετίζεται με αναστολή σε επίπεδο έκφρασης των γονιδίων τους, όπως έχει καταγραφεί και σε άλλες περιπτώσεις (Huang *et al.*, 2006; Neyestani *et al.*, 2009; Shin *et al.*, 2007). Ο προτεινόμενος μηχανισμός δράσης αφορά στην αναστολή ενεργοποίησης των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB και AP-1, κάτω από τον έλεγχο των οποίων βρίσκεται ένα μεγάλο σύνολο προφλεγμονωδών κυτταροκινών (Paur *et al.*, 2008). Στη μελέτη ανασκόπησης των Leyva-López και συνεργατών επιβεβαιώθηκε η αντιφλεγμονώδης δράση ορισμένων φλαβονοειδών, η οποία εκδηλώθηκε επίσης μέσω της αναστολής των NF-κB και AP-1 (Leyva-López *et al.*, 2016). Η προσπάθεια συσχέτισης της αντιφλεγμονώδους δράσης με συγκεκριμένες φαινολικές ενώσεις δεν έχει ακόμη αποδώσει καρπούς (Ribeiro *et al.*, 2015b), ωστόσο χαρακτηριστικά των φλαβονοειδών μορίων όπως (I) ένα επίπεδο σύστημα δακτυλίων, (II) η ακορεστότητα του δακτυλίου C στη θέση C2-C3, (III) ο αριθμός και η θέση των ομάδων OH στους δακτυλίου A και B, ιδιαίτερα στις C5 και C7 θέσεις του δακτυλίου A και στις C3’ και C4’ θέσεις του δακτυλίου B και (IV) η κετονομάδα στο C4 του δακτυλίου C, σχετίζονται θετικά με την εκδήλωση αντιφλεγμονώδους δράσης ενώ (I) η απουσία ομάδων OH στο δακτύλιο B και

(ΙΙ) η παρουσία σακχάρου στο μόριο σχετίζονται αρνητικά (Gautam and Jachak, 2009; Lago *et al.*, 2014). Ένα παράδοξο εύρημα της παρούσας μελέτης ήταν η αύξηση της έκκρισης των προφλεφμονωδών κυτταροκινών TNF-α και IL-6 σε επίπεδα υψηλότερα του θετικού μάρτυρα από ορισμένα αφεψήματα, υποδεικνύοντας την εκδήλωση προφλεγμονώδους δράσης (Διαγράμματα 3.7 και 3.8). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το λιποπολυσακχαρίδιο (LPS) ως παράγοντας για την ενεργοποίηση των κυττάρων της άμυνας. Η χρήση της συγκεκριμένης τοξίνης αποτελεί κοινή επιλογή για την προσομοίωση της φλεγμονώδους διαδικασίας όταν αξιολογείται η αντιφλεγμονώδης δράση εκχυλισμάτων βοτάνων (Allen-Hall *et al.*, 2007). Έχει αναφερθεί επίσης η χρήση της oxLDL ως διεγέρτη μακροφάγων , προσομοιώνοντας *in vitro* την αθηρωματική διαδικασία (Arranz *et al.*, 2015; Call *et al.*, 2004). Αναφορικά με το LPS, αυτό αποτελεί μια ενδοτοξίνη που εντοπίζεται στην μεμβράνη των Gram-αρνητικών βακτηριδίων, η οποία επάγει άμεσα την έκκριση κυτταροκινών από τα μακροφάγα έπειτα από σύνδεση στους υποδοχείς της (Wong *et al.*, 2000). Αρχικά, ως απάντηση στη μόλυνση, εκκρίνεται από τα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα η κυτταροκίνη IL-1β (Dinarello, 1992). Στη συνέχεια, η IL-1β επάγει την έκκριση των TNF-α και IL-6 (Netea *et al.*, 2010; Tosato and Jones, 1990). Στο σύνολό τους οι κυτταροκίνες αυτές διεγείρουν τη φαγοκυττάρωση των παθογόνων από ουδετερόφιλα και μακροφάγα και συμβάλουν στην απελευθέρωση δραστικών ενώσεων οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS), οι οποίες αποτελούν σημαντικά μόρια στην άμυνα έναντι των παθογόνων (Netea *et al.*, 2010). Πιθανώς η αυξημένη παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών να είναι το προϊόν της ευαισθητοποίησης των PBMCs, ως απόκριση στο βακτηριακό ερέθισμα, παρά η έκφραση προφλεγμονώδους δράσης. Η παραπάνω υπόθεση φάνηκε να είναι και η ερμηνεία της αυξημένης παραγωγής TNF-α και IL-6, που καταγράφηκε σε δυο *ex vivo* δοκιμές όπου εξετάστηκε η αντιφλεγμονώδης δράση, έπειτα από διατροφική παρέμβαση, με φράουλες και σταφύλι σε παχύσαρκους εθελοντές (Zunino *et al.*, 2014; Zunino *et al.*, 2013).

Πέρα από την καρδιαγγειακή νόσο, ένα μείζον ιατρικό ζήτημα της σύγχρονης εποχής είναι ο καρκίνος, αφενός διότι αποτελεί μια από τις κυριότερες αιτίες θνησιμότητας παγκοσμίως (Ferlay *et al.*, 2015) και αφετέρου λόγω της χαμηλής ποιότητας διαβίωσης των καρκινοπαθών ασθενών (Tsilidis *et al.*, 2016). Για την εκδήλωση της νόσου είναι υπεύθυνοι τόσο γενετικοί όσο και περιβαλλοντικοί παράγοντες, με τη διατροφή να διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο. Θεραπευτικά, ένας από τους κύριους στόχους της σύγχρονης πειραματικής ογκολογίας είναι η ανακάλυψη αντικαρκινικών παραγόντων που να επιδεικνύουν την ικανότητα εκλεκτικής αναστολής του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων, ασκώντας ελάχιστη τοξικότητα σε υγιή κύτταρα, ιδιαίτερα στα μονοπύρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος (PBMC), τα

οποία εμπλέκονται στην εκκαθάριση και γενικότερα στην άμυνα έναντι του καρκίνου στον άνθρωπο. Προς αυτήν την κατεύθυνση, τα αποτελέσματα της έρευνας αναδεικνύουν τη σημασία των φαρμακευτικών φυτών ως πηγής βιοδραστικών φυτοχημικών, τα οποία μπορούν να δράσουν χημειοπροστατευτικά ή/και χημειοθεραπευτικά (Mehta *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2009), χωρίς να προκαλών βλάβες στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (Kontogianni *et al.*, 2013; Matic *et al.*, 2013). Στην παρούσα μελέτη τα αφεψήματα των βοτάνων παρουσίασαν ελάχιστη τοξικότητα στα PBMCs ακόμα και σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις (Πίνακας 3.5). Η παρατήρηση αυτή έδωσε ιδιαίτερο νόημα στην περαιτέρω διερεύνηση της βιολογικής δράσης των αφεψημάτων ως χημειοπροστατευτικών παραγόντων.

Η καρκινογένεση αποτελεί μια σύνθετη και πολύπλοκη διαδικασία, κατά την οποία συμβαίνουν διακριτές κυτταρικές και μοριακές τροποποιήσεις (Franco *et al.*, 2008; Kryston *et al.*, 2011). Ο ρόλος της φλεγμονής στην έναρξη και εξέλιξη του όγκου, είναι επιβεβαιωμένος (Vendramini-Costa and Carvalho, 2012). Ένα από τα πλέον εμπλεκόμενα μόρια είναι ο μεταγραφικός παράγοντας, Πυρηνικός Παράγοντας-κΒ (NF-κΒ), αφενός λόγω της συμμετοχής του ως ρυθμιστής ανοσοβιολογικών αποκρίσεων (Berkovich *et al.*, 2012) και αφετέρου λόγω του γεγονότος ότι υπό τον έλεγχό του βρίσκονται γονίδια που συμμετέχουν στον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων καθώς και στην αγγειογένεση και τη μετάσταση (Li *et al.*, 2015). Η χημειοπροστατευτική δράση των διαιτητικών φυτοχημικών έγκειται στην τροποποίηση ποικίλων σηματοδοτικών μοναπατιών, επιδρώντας, άμεσα ή έμμεσα, στα εμπλεκόμενα μόρια (Aggarwal and Shishodia, 2006). Τα αφεψήματα των βοτάνων, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, περιέχουν πλήθος συστατικών τα οποία μπορούν να δράσουν χημειοπροστατευτικά αναστέλλοντας την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων και προφλεγμονωδών μορίων. Στην παρούσα μελέτη επιβεβαιώθηκε η ικανότητα των αφεψημάτων να δρουν χημειοπροστατευτικά, αναστέλλοντας την επαγόμενη φλεγμονή και χημειοταξία στις καρκινικές σειρές HT29 (παχέος εντέρου) και PC3 (προστάτη) *in vitro*. Στα Διαγράμματα 3.12 και 3.17 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την αξιολόγηση των επιπέδων της χημειοκίνης IL-8 παρουσία των αφεψημάτων, στα PC3 και τα HT29, αντίστοιχα. Στο σύνολό τους τα αφεψήματα ανέστειλαν την έκκριση της IL-8, ωστόσο καμία συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των επί μέρους συστατικών τους και της αντιφλεγμονώδους δράσης. Με σκοπό να μελετηθεί ο μηχανισμός μέσω του οποίου επάγεται η δράση των αφεψημάτων, εκτιμήθηκαν περαιτέρω τα επίπεδα ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ, κάτω από τον έλεγχο του οποίου βρίσκεται το γονίδιο της IL-8 (Διαγράμματα 3.13 και 3.18 για τα PC3 και HT29, αντίστοιχα). Από την συνολική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων φάνηκε ότι η παρατηρούμενη μείωση στα επίπεδα της IL-8 δεν ήταν αποτέλεσμα της απενεργοποίησης του

NF-κB. Το γονίδιο της IL-8 βρίσκεται υπό τον έλεγχο του NF-κB και άλλων μεταγραφικών παραγόντων, όπως η AP-1, τα επίπεδα ενεργοποίησης της οποίας δεν εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη. Πιθανώς, η μείωση της έκφρασης της χημειοκίνης να απαιτεί την αναστολή ενός ή/και των δυο μεταγραφικών παραγόντων, όπως παρατηρήθηκε για την εσπεριδίνη (Yeh *et al.*, 2007). Συνεχίζοντας, η αναστολή της ενεργοποίησης του NF-κB συσχετίσθηκε με τα υδροξυ-κινναμωμικά οξέα, παρουσιάζοντας βαθμό συσχέτισης R=0.886 ($P < 0.001$) για τα PC3 και R=0.726 ($P < 0.01$) για τα HT29 και ειδικότερα, με το 3-4 διυδροξυφαινυλοξικό οξύ (R=0.909, $P < 0.001$ και R=0.765, $P < 0.01$, για τα PC3 και HT29, αντίστοιχα), το ροσμαρινικό οξύ (R=0.888, $P < 0.001$ και R=0.721, $P < 0.01$ για τα PC3 και HT29, αντίστοιχα), καθώς και το ολεανολικό οξύ (R=0.742, $P < 0.01$ και R=0.618, $P < 0.05$ για τα PC3 και HT29, αντίστοιχα). Βιβλιογραφικές αναφορές, επιβεβαιώνουν την ικανότητα του ολεαλονικού οξέος αλλά και του ουρσολικού οξέος να επεμβαίνουν στην ενεργοποίηση του NF-κB, σε καρκινική σειρά του πνεύμονα (A549) με αποτέλεσμα την επαγωγή της απόπτωσης (Shyu *et al.*, 2010). Η χρυσίνη, η οποία βρέθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στα αφεψήματα Σπαθόχορτου και Χαμομηλιού, φαίνεται εν μέρει να εξηγεί την ικανότητα τους να αναστέλλουν την ενεργοποίηση του NF-κB στα HT29, καθώς έχει επιβεβαιωθεί η αντιφλεγμονώδης δράσης της έναντι διεγερμένων με TNF-α καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (Caco 2), μέσω αυτού του μηχανισμού (Romier *et al.*, 2008). Αναστολή της ενεργοποίησης του NF-κB στο καρκίνο του παχέος εντέρου, έχει καταγραφεί επίσης για τη λουτεολίνη (Karrasch *et al.*, 2007) και την κερκετίνη. Ειδικότερα, η χημειοπροστατευτική δράση της κερκετίνης, κύριου φλαβονοειδούς του αφεψήματος από Σπαθόχορτο, στο καρκίνο του παχέος εντέρου, μέσω αναστολής της ενεργοποίησης του NF-κB έχει αναφερθεί σε πλήθος μελετών συνεπάγοντας την αναστολή της φλεγμονής και της μετάστασης αλλά και την επαγωγή της απόπτωσης (Han *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2015b). Η ικανότητα των φλαβονοειδών να αναστέλλουν τον NF-κB, σε καρκινική σειρά του παχέος εντέρου (HCT-116), έχει συσχετιστεί με τη δομή τους. Συγκεκριμένα οι Shin και συνεργάτες ανέφεραν ότι το ιδανικό μόριο θα πρέπει να έχει (I) έναν ηλεκτραρνητικό υποκαταστάτη στη θέση C5 του δακτυλίου A, (II) έναν ογκώδη υποκαταστάτη σε *meta* θέση στον δακτύλιο B, και (III) έναν υδρόφοβο υποκαταστάτη σε *meta* θέση στον δακτύλιο B (Shin *et al.*, 2011).

Τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν αυξημένη ικανότητα ανάπτυξης και αντίστασης στην απόπτωση, ως αποτέλεσμα μεταλλάξεων σε μόρια σηματοδότησης, τα οποία ρυθμίζουν μονοπάτια που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων (Moore *et al.*, 2016). Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων τα φυτοχημικά συστατικά εκδηλώνουν

χημειοπροστατευτική δράση αφορούν στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου ή/και την επαγωγή του κυτταρικού θανάτου. Στην παρούσα μελέτη επιβεβαιώθηκε η ικανότητα των αφεψημάτων να αναστέλλουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου και του προστάτη μέσω και των δυο προαναφερθέντων μηχανισμών (Εικόνες 3.4Β-3.16Β για τα PC3 και 3.18Β-3.30Β για τα HT29). Ειδικότερα, τα αφεψήματα στην πλειοψηφία τους ανέστειλαν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων PC3 με δοσο- και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο. Το αφέψημα Μελισσόχορτου φάνηκε να επιδεικνύει ισχυρότερη ανασταλτική δράση, ενώ λιγότερο δραστικό φάνηκε αυτό του Χαμομηλιού. Για τα υπόλοιπα βότανα η σειρά κατάταξης είχε ως εξής: Δενδρολίβανο < Αντωναΐδα < Τσάι βουνού < Φλισκούνι < Θρύμπα < Ρίγανη < Φασκόμηλο < Σπαθόχορτο < Δίκταμο < Μαντζουράνα < Θυμάρι. Η αναστολή στην ανάπτυξη των PC3, συσχετίσθηκε με την παρουσία των υδροξυ-κινναμωμικών οξέων (R=0.565, $P < 0.05$), και συγκεκριμένα με το ροσμαρινικό (R=0.599, $P < 0.05$) και το καφεϊκό οξύ (R=0.592, $P < 0.05$) καθώς και με τα τερπενικά οξέα, συνολικά (R=0.592, $P < 0.05$). Αναφορικά με τη δράση των αφεψημάτων στα κύτταρα του παχέος εντέρου, πάλι το αφέψημα Μελισσόχορτου φάνηκε πιο αποτελεσματικό αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό περισσότερο από 80 %, ενώ το λιγότερο δραστικό φάνηκε το αφέψημα Αντωναΐδας. Για τα υπόλοιπα βότανα η σειρά κατάταξης είχε ως εξής: Δενδρολίβανο < Φασκόμηλο < Χαμομήλι < Θυμάρι < Θρύμπα < Μαντζουράνα < Δίκταμο < Ρίγανη < Τσάι βουνού < Σπαθόχορτο < Φλισκούνι, ενώ από τη συσχέτιση των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι, η δράση των αφεψημάτων στα HT29 συσχετίσθηκε με το *p*-κουμαρικό οξύ (R=0.739, $P < 0.01$). Αξιολογώντας τα αποτελέσματα συνολικά προκύπτει ότι το αφέψημα του Μελισσόχορτου είναι το πιο αποτελεσματικό στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Η επίδραση του Μελισσόχορτου σε καρκινικά κύτταρα έχει επιβεβαιωθεί στη βιβλιογραφία και η δράση του έχει εν μέρει αποδοθεί , στο ροσμαρινικό οξύ, όπως και στην παρούσα μελέτη. Συγκεκριμένα, στη μελέτη των Encalada και συνεργατών, βρέθηκε ότι τόσο το εκχύλισμα Μελισσόχορτου όσο και το ροσμαρινικό οξύ, ήταν ικανά να επάγουν την αναστολή του πολλαπλασιασμού σε καρκινική σειρά του παχέος εντέρου (HT-116) (Encalada *et al.*, 2011). Επιπρόσθετα, στη μελέτη των Weidner και συνεργατών, το υδρο-αιθανολικό εκχύλισμα Μελισσόχορτου ανέστειλε ισχυρά την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (HT29, T84) και οι ερευνητές υπέθεσαν ότι η έντονη ανασταλτική του δράση σχετίζεται με τα κυρίαρχα συστατικά του (Weidner *et al.*, 2015). Τα αποτελέσματα και άλλων ερευνητικών ομάδων επιβεβαιώνουν τη δράση των εκχυλισμάτων Μελισσόχορτου σε καρκινικές σειρές του μαστού (MCF-7, MDA-MB-468, MDA-MB-231) (Čanadanović-Brunet *et al.*, 2008; Saraydin *et al.*, 2012), του τραχήλου της μήτρα και των ωοθηκών (HeLa, SKOV3) (Čanadanović-Brunet *et al.*, 2008; Jahanban-Esfahlan *et al.*, 2015),

του αίματος (Jurkat, K562) (Ebrahimnezhad Darzi and Amirghofran, 2013), του προστάτη (PC3) (Jahanban-Esfahlan *et al.*, 2015) κ.α. Αντικείμενο έρευνας έχει αποτελέσει επίσης το καφεϊκό οξύ και τα παράγωγά του. Συγκεκριμένα, στη μελέτη ανασκόπησης των Touaibia και συνεργατών, επιβεβαιώθηκε η ικανότητα του καφεϊκού οξέος να παρουσιάζει χημειοπροστατευτική δράση έναντι πολλών τύπων καρκίνου αναστέλλοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη φλεγμονή μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών στα οποία συμμετέχει ο NF-κB και άλλα μόρια (Touaibia *et al.*, 2011). Αναφορικά με τη δράση του *p*-κουμαρικού οξέος, στη βιβλιογραφία έχει επιβεβαιωθεί η ικανότητά του να επάγει την αναστολή του πολλαπλασιασμού κυρίως σε καρκινικές σειρές του παχέος εντέρου (Caco 2, HCT-15, HT29), με δοσο- και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο (Jaganathan *et al.*, 2013; Janicke *et al.*, 2005). Επίσης έχει αναφερθεί η ικανότητά του να επηρεάζει καρκινικά κύτταρου του μαστού και του τραχήλου της μήτρας (MCF-7, HeLa) (Saenglee *et al.*, 2016) καθώς και του πνεύμονα (A549, NCI-H1299, HCC827) (Peng *et al.*, 2015), ωστόσο, δεν υπάρχουν αναφορές που εκτιμούν τη δράση του στον καρκίνο του προστάτη. Η γνωστή από τη βιβλιογραφία επιλεκτική δράση των φυτοχημικών έναντι των διαφορετικών τύπων καρκίνου επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα και της παρούσας μελέτης. Αναφορικά με τα τερπενικά οξέα, τα οποία συσχετίστηκαν με την καταγραφόμενη αναστολή του πολλαπλασιασμού στα PC3, η ικανότητά τους να επιδρούν στην ανάπτυξη ποικίλων κυτταρικών τύπων έχει επίσης επιβεβαιωθεί βιβλιογραφικά. Συγκεκριμένα, οι Wiemann και συνεργάτες μελέτησαν την ικανότητα του ολεανολικού και του ουρσολικού οξέος να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των 518A2, A2780, A549, FaDu, HT29 και MCF-7 κυττάρων. Τα αποτελέσματα της μελέτης τους αναδεικνύουν την ισχυρότερη ανασταλτική ικανότητα του ουρσολικού οξέος, έναντι του ολεανολικού, ωστόσο και τα δυο τριτερπενικά οξέα επέδειξαν χημειοπροστατευτική δράση, η οποία φάνηκε επίσης να επηρεάζεται από τον τύπο καρκίνου που μελετήθηκε (Wiemann *et al.*, 2016). Τα αποτελέσματα μιας ακόμα μελέτης επιβεβαιώνουν την ικανότητα του ουρσολικού οξέος να επιδρά σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του μαστού (MCF-7, T47D, MDA-MB-231 και MDA-MB-361) αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό, εν αντιθέσει με το ολεανολικό οξύ το οποίο δεν παρουσίασε χημειοπροστατευτική δράση (Oprean *et al.*, 2016). Αξίζει να αναφερθεί στο σημείο αυτό, ότι δεν παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ της αναστολής του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων και των τερπενικών φαινολών και των φλαβονοειδών που απαντούν στα αφεψήματα. Ωστόσο, η δράση της καρβακρόλης (κυρίαρχου συστατικού του αφεψήματος Ρίγανης) και των φλαβονοειδών έχει καταγραφεί σε πλήθος μελετών, σε καρκινικές σειρές του προστάτη και του παχέος εντέρου, (Baruah *et al.*, 2016; Encalada *et al.*, 2011; Fan *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2014; Modernelli *et al.*, 2015; Patel *et al.*, 2012; Romier *et al.*, 2008; Savini *et al.*, 2009; Shukla *et al.*,

2015; Yang *et al.*, 2016). Συνεπώς κατά την εκδήλωση της χημειοπροστατευτικής δράσης των αφεψημάτων, υπό τις πειραματικές συνθήκες που εφαρμόστηκαν για την αξιολόγηση της, είναι πολύ πιθανό να αναπτύσσονται μεταξύ των συστατικών τους, συνεργιστικές ή/και ανταγωνιστικές σχέσεις. Στο συμπέρασμα αυτό καταλήγουν και άλλες ερευνητικές ομάδες που μελέτησαν τη δράση εκχυλισμάτων βοτάνων και των μεμονωμένων συστατικών που περιέχουν (Kontogianni *et al.*, 2013; Mertens-Talcott *et al.*, 2003; Savini *et al.*, 2009).

Όσον αφορά στην επίδραση των αφεψημάτων στον κυτταρικό κύκλο, στο σύνολό τους επέδειξαν την ικανότητα να αναχαιτίζουν τόσο τα PC3 (Εικόνες 3.4Δ-3.16Δ) όσο και τα HT29 (Εικόνες 3.18Δ-3.30Δ) και στις τρεις φάσεις του κύκλου ανάπτυξης (G0/G1, S, G2/M). Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι διαφορετικά συστατικά είναι υπεύθυνα για την αναστολή του κυτταρικού κύκλου και στις δυο κυτταρικές σειρές. Ειδικότερα, μεταξύ των συγκεντρώσεων που εφαρμόστηκαν στις καλλιέργειες, καταγράφηκε υπό περιπτώσεις αναστολή σε διαφορετικές φάσεις του κύκλου. Τα αφεψήματα περιέχουν ένα σύνολο συστατικών η αφθονία των οποίων παρουσιάζει μεγάλες διαφορές, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις στην καλλιέργεια. Πιθανώς να υπάρχει μια ελάχιστη συγκέντρωση για να εκδηλωθεί η δράση τους ή/και η καταγραφόμενη δράση να είναι το αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης μεταξύ των διαφόρων συστατικών (συνεργιστικές ή/και ανταγωνιστικές σχέσεις) (Mertens-Talcott *et al.*, 2003). Αναφορικά με την αναστολή στη φάση αντιγραφής του κυτταρικού κύκλου, μηχανισμός μέσω του οποίου τα περισσότερα αφεψήματα της μελέτης ανέστειλαν την ανάπτυξη των PC3 και κυττάρων HT29, αυτό έχει παρατηρηθεί επίσης έπειτα από επώαση καρκινικών κυττάρων με φυσικά φυτοχημικά, όπως η κερκετίνη και η ρεσβερατρόλη. (van Erk *et al.*, 2005; Wolter *et al.*, 2001). Συγκεκριμένα, η επώαση των Caco 2 (καρκινική σειρά του παχέος εντέρου) με κερκετίνη επάγει τη μείωση της έκφρασης των CDK4 και κυκλίνης D1, που είναι υπεύθυνες για τη μετάβαση από τη φάση G0/G1 στην S, καθώς και της πρωτεΐνης CDC6, η οποία συμμετέχει στην αντιγραφή του DNA κατά τη φάση S, με αποτέλεσμα την αναστολή στη φάση αυτή. Η μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης CDC6, με αποτέλεσμα την αναστολή στη φάση S έχει επιβεβαιωθεί ως μηχανισμός δράσης και για τη γενιστεΐνη σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη (Suzuki *et al.*, 2002). Η αναστολή στη φάση S του κυτταρικού κύκλου έχει παρατηρηθεί και για τα υδροξυ-κινναμωμικά οξέα φερουλικό και καφεΐκό σε καρκινικά κύτταρα του μαστού και του τραχήλου της μήτρας, μέσω αύξησης της πρωτεΐνης p21, η οποία διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη μετάβαση από τη φάση G0/G1 στην S (Saenglee *et al.*, 2016). Τέλος, αναφορικά με τη διάρκεια παραμονής των κυττάρων στη φάση S, πιθανώς να μην είναι μια στατική κατάσταση, αλλά όπως ανέφεραν οι Borel και συνεργάτες μελετώντας τη δράση της αφιδικολίνης σε

κύτταρα HeLa, η 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 (Borel *et al.*, 2002).

Τα μιτοχόνδρια είναι υποκυτταρικά οργανίδια, τα οποία αποτελούν το «αναπνευστικό» και το «ενεργειακό» κέντρο των κυττάρων, με αποτέλεσμα να διαδραματίζουν κύριο ρόλο στη ρύθμιση της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης και της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης των φυσιολογικών και των καρκινικών κυττάρων. Βάσει των παραπάνω λειτουργιών, τα μιτοχόνδρια συμμετέχουν άμεσα ή έμμεσα στον έλεγχο ενός μεγάλου αριθμού κυτταρικών διαδικασιών, συμπεριλαμβανομένων του πολλαπλασιασμού, της σύνθεσης ATP και του κυτταρικού θανάτου (Handy and Loscalzo, 2012). Λόγω της συμμετοχής τους στην αποπτωτική διαδικασία, γίνεται έρευνα προς την κατεύθυνση της ανάδειξης συστατικών που θα μπορούσαν να τροποποιήσουν τη μιτοχονδριακή λειτουργία ώστε επιλεκτικά να προκαλέσουν το θάνατο των κυττάρων (Weissig, 2003). Για την εκτίμηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας παρουσία των αφεψημάτων, χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο MTT, το οποίο τροποποιείται ενζυματικά εντός των μιτοχονδρίων από την γαλακτική αφυδρογονάση. Η χρήση της συγκεκριμένης μεθόδου βρίσκει ευρεία εφαρμογή στον έμμεσο προσδιορισμό της ικανότητας των κυττάρων να πολλαπλασιάζονται παρουσία ή όχι κάποιου παράγοντα (Bunel *et al.*, 2014; PubMed, 2016). Όπως παρουσιάζεται στις Εικόνες 3.4-3.16 και 3.18-3.30, για τα PC3 και τα HT29, αντίστοιχα, καταγράφηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων των δυο μεθόδων εκτίμησης της ικανότητας πολλαπλασιασμου των κυττάρων που εφαρμόστηκαν, δηλαδή (A) της χρήσης MTT και (B) της χρώσης ζώντων κυττάρων με κρυσταλλικό ιώδες (Crystal Violet), οι οποίες ανέδειξαν την ικανότητα των αφεψημάτων να επάγουν τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία χωρίς ωστόσο να σημειωθεί συσχέτιση με την απόπτωση. Αντίθετα, στη μελέτη των Kontogianni και συνεργατών, αν και δε μελετήθηκε ο μηχανισμός με τον οποίο παρουσιάζεται η δράση, καταγράφηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της αναστολής της λειτουργίας των μιτοχονδρίων (αξιολόγηση με χρήση του MTT) και της επαγωγής της απόπτωσης στα RINm5F κύτταρα, παρουσία εκχυλισμάτων Δενδρολίβανου και Φασκόμηλου (Kontogianni *et al.*, 2013).

Τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα δραστικών ενώσεων οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), σε σύγκριση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά κύτταρα, λόγω αυξημένου μεταβολικού ρυθμού, μεταβολών στο μεταβολισμό του O_2 κατά τις διαδικασίες παραγωγής ενέργειας, και αυξημένης ενζυμικής δραστηριότητας (Cairns *et al.*, 2011; López-Lázaro, 2010). Τα αυξημένα κυτταρικά επίπεδα ROS σχετίζονται με βασικές πτυχές της διαδικασίας της καρκινογένεσης, που συμπεριλαμβάνουν την πρόκληση γενετικών αλλοιώσεων,

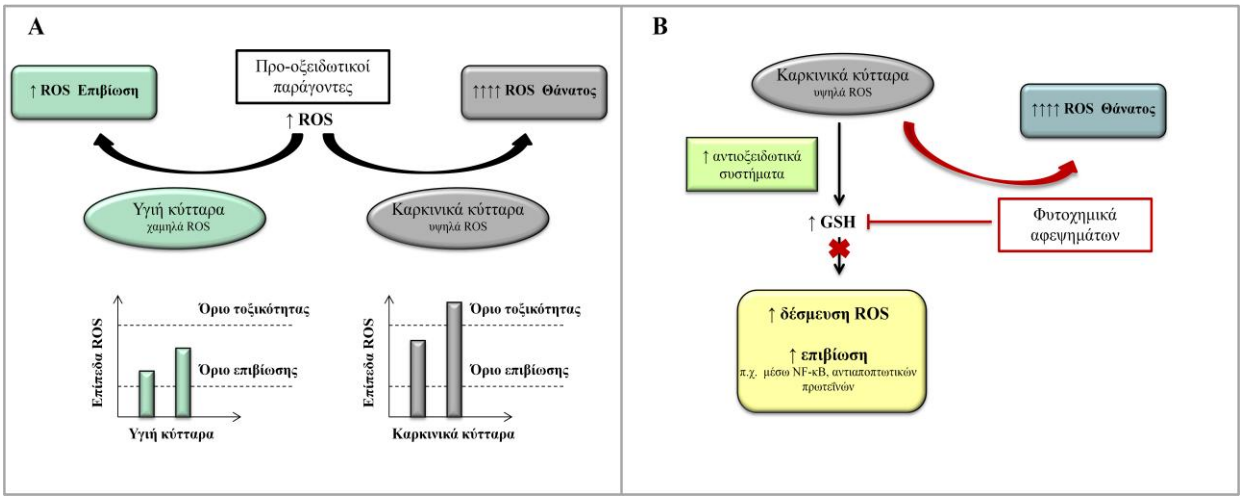
τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την αντίσταση στην απόπτωση, τη μετάσταση και την αγγειογένεση (León-González *et al.*, 2015). Η αυξημένη παραγωγή ROS έχει οδηγήσει τα καρκινικά κύτταρα να αναπτύξουν έναν αποτελεσματικό μηχανισμό απομάκρυνσης των ROS, αποσκοπώντας στην επιβίωση. Ως εκ τούτου, η εξάρτηση των καρκινικών κυττάρων από τα αντιοξειδωτικά τους συστήματα μπορεί να αξιοποιηθεί για την πρόκληση κυτταρικού θανάτου (Panieri and Santoro, 2016). Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί για την επίτευξη του προαναφερθέντος, στοχεύουν στην αύξηση των επιπέδων του οξειδωτικού στρες των καρκινικών κυττάρων πάνω από το όριο τοξικότητας, μέσω της περαιτέρω αύξησης των ενδοκυτταρικών επιπέδων ROS (σύμφωνα με τη θεωρία κατωφλίου, threshold theory), κάτι που προκαλεί ελάχιστες συνέπειες στα φυσιολογικά κύτταρα, τα οποία χαρακτηρίζονται από χαμηλότερα επίπεδα οξειδωτικού στρες ή/και μέσω της μείωσης της αντιοξειδωτικής τους άμυνας (σύμφωνα με τη θεωρία οξειδωτικής προσαρμογής, redox adaptation) (Εικόνα 4.1) (León-González *et al.*, 2015; Panieri and Santoro, 2016; Yang *et al.*, 2013).

Η ικανότητα των εκχυλισμάτων βοτάνων αλλά και των φυτοχημικών που περιέχουν να δρουν προοξειδωτικά επάγοντας την παραγωγή των ROS έχει επιβεβαιωθεί από πλήθος μελετών (Hwang *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2013; Lambert and Elias, 2010; Weidner *et al.*, 2015). Στην παρούσα μελέτη, η επώαση των καρκινικών κυττάρων, PC3 και HT29, με τα αφεψήματα των βοτάνων δεν προκάλεσε αύξηση των επιπέδων των ενδοκυττάριων ROS. Ωστόσο βρέθηκε ότι τα αφεψήματα είναι ικανά να αυξάνουν τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες των PC3 και κυττάρων HT29, ενδεχομένως μη αντιστρεπτά, καθώς σημειώθηκε σημαντική μείωση στα επίπεδα της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης (GSH).

Η μείωση της GSH, μπορεί να είναι το αποτέλεσμα ποικίλων διαδικασιών ως απάντηση σε εξω- ή/και ενδο-κυτταρικά ερεθίσματα, με αποτέλεσμα την επαγωγή της απόπτωσης, αν και έχει αναφερθεί ότι η μείωσή της υπό περιπτώσεις δεν είναι επαρκής για να οδηγηθούν τα καρκινικά κύτταρα σε θάνατο (Ghibelli *et al.*, 1999). Γενικά, η εξάντληση της γλουταθειόνης κατά την απόπτωση μπορεί να προκύψει από διακριτούς μηχανισμούς όπως: (I) διαφυγή της GSH από το κύτταρο μέσω μεταφορέων ή αντλιών, ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των υποδοχέων θανάτου, (II) μετατροπή της στο διμοριακό παράγωγό της (GSSG), ως αποτέλεσμα ενεργοποίησης του ενδογενούς μονοπατιού της απόπτωσης, (III) άμεση οξείδωση ή/και σύζευξή της από προοξειδωτικούς παράγοντες και (IV) διαφυγή των μορίων GSSG και των συζευγμένων παραγώγων (GSH-οξειδωτικός παράγοντας) για την αποφυγή περαιτέρω αλλοιώσεων στο εσωτερικό του κυττάρου. Άλλοι μηχανισμοί, όπως η ανεπάρκεια της σύνθεσης και της

αναγέννησης της GSH θα μπορούσαν επίσης να συμβάλουν στη μη αντιστρεπτή μείωση της γλουταθειόνης κατά την απόπτωση (Franco and Cidlowski, 2009).

Από τη συνολική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων συμπεραίνεται ότι τα αφεψήματα των βοτάνων δεν επάγουν την παραγωγή δραστικών ενώσεων οξυγόνου αλλά μεταβάλουν τα επίπεδα οξειδωτικού στρες των HT29 και PC3 μέσω της μείωσης της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης (GSH), γεγονός που πιθανά σχετίζεται με την πρόκληση κυτταρικού θανάτου μέσω του ενδογενούς μονοπατιού που μεσολαβείται από τα μιτοχόνδρια ή/και του εξωγενούς μονοπατιού που μεσολαβείται από τους υποδοχείς κυτταρικού θανάτου (Εικόνα 4.1Β).



Εικόνα 4.1 (Α) Θεωρία κατωφλίου (Threshold theory): Τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα δραστικών ενώσεων οξυγόνου (ROS), σε σύγκριση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά. Η επαγωγή του κυτταρικού θανάτου στα καρκινικά κύτταρα είναι αποτέλεσμα της περαιτέρω αύξησης των ROS, πάνω από το όριο τοξικότητας. Τα φυσιολογικά κύτταρα διαφεύγουν του κυτταρικού θανάτου καθώς επιδεικνύουν μεγαλύτερη ανοχή στην αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων ROS. (Β) Θεωρία οξειδωτικής προσαρμογής (Redox adaptation): Η επιβίωση των καρκινικών κυττάρων εξαρτάται από την αυξημένη λειτουργία των αντιοξειδωτικών τους συστημάτων. Η μείωση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού των καρκινικών κυττάρων επάγει την απόπτωση, μέσω έμμεσης αύξησης των ενδοκυτταρικών επιπέδων ROS. Ο μηχανισμός δράσης των φυτοχημικών συστατικών των αφεψημάτων στην επαγωγή της απόπτωσης, πιθανώς σχετίζεται με την παρατηρούμενη μείωση των επιπέδων της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης (GSH), που οδηγεί στην επαγωγή του οξειδωτικού στρες

4.2 Σύνοψη Αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής κατέδειξαν ότι τα φυτοχημικά που είναι παρόντα στα αφεψήματα Ελληνικών βοτάνων, είναι υπεύθυνα για την εκδήλωση αντιοξειδωτικής, αντιαθηρογόνου, αντιφλεγμονώδους και χημειοπροστατευτικής δράσης σε ανθρώπινα κύτταρα *in vitro*. Τα Ελληνικά βότανα, τα αφεψήματα των οποίων αξιολογήθηκαν, ήταν τα εξής: Αντωναΐδα (*Origanum microphyllum*), Δενδρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*), Δίκταμο (*Origanum dictamnus*), Θρύμπα (*Satureja thymbra*), Θυμάρι (*Thymus vulgaris*), Μαντζουράνα (*Origanum majorana*), Μελισσόχορτο (*Melissa officinalis*), Ρίγανη (*Origanum vulgare*), Σπαθόχορτο (*Hypericum perforatum*), Τσάι βουνού (*Sideritis syriaca*), Φασκόμηλο (*Salvia officinalis*), Φλισκούνι (*Mentha pulegium*) και Χαμομήλι (*Matricaria* chamomilla). Πρόκειται για την πρώτη μελέτη κατά την οποία αξιολογήθηκαν ολιστικά τα αφεψήματα ενός πλήθους αρωματικών φυτών του Ελλαδικού χώρου, δηλαδή υπό τη μορφή προσιτών στους καταναλωτές διατροφικών συστατικών, εκδηλώνοντας σημαντικές δράσεις έναντι χρόνιων νοσημάτων *in vitro*.

Όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων, τα αφεψήματα περιείχαν σημαντικές ποσότητες φυτοχημικών συστατικών. Το ροσμαρινικό οξύ και η τερπενοειδής φαινόλη καρβακρόλη σημείωσαν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ανά κούπα στην πλειοψηφία των αφεψημάτων της οικογένειας Lamiaceae, ενώ τα αφεψήματα Σπαθόχορτου και Χαμομηλιού παρουσίασαν τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή. Τα αφεψήματα περιείχαν επίσης συζευγμένα παράγωγα φλαβονοειδών ενώ η γεύση και το άρωμά τους αποδόθηκε στην παρουσία πλήθους μονοτερπενίων.

Όλα τα αφεψήματα των βοτάνων παρουσίασαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση μέσω της δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας $DPPH^{\bullet}$, της ικανότητας αναγωγής ιόντων τρισθενούς σιδήρου και μέσω του σχηματισμού χηλικών συμπλόκων με κατιόντα σιδήρου και χαλκού. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των αφεψημάτων συσχετίσθηκε πολύ καλά με το πολυφαινολικό τους περιεχόμενο.

Τα αφεψήματα των βοτάνων ανέστειλαν με δοσοεξαρτώμενο τρόπο την επαγόμενη από ιόντα χαλκού οξείδωση των λιποπρωτεϊνών του ορού επιδεικνύοντας αντιαθηρογόνο δράση. Τα αφεψήματα Μελισσόχορτου, Ρίγανης, Σπαθόχορτου και Χαμομηλιού έδρασαν ευεργετικά σε διεγερμένα από LPS μονοπύρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος, επιδεικνύοντας αντιφλεγμονώδη δράση η οποία αξιολογήθηκε μέσω της μείωσης των επιπέδων TNF-α, IL-6 και MCP-1, χωρίς να σημειωθεί δοσοεξαρτώμενη σχέση. Τα υπόλοιπα αφεψήματα μείωσαν τα

επίπεδα των κυτταροκινών ανά περιπτώσεις, ενώ η επιλεκτική αύξηση των επιπέδων έκκρισης TNF-α και IL-6 από ορισμένα αφεψήματα πιθανώς να είναι αποτέλεσμα της ευαισθητοποίησης των PBMCs, ως απόκριση στο βακτηριακό ερέθισμα, και όχι έκφραση προφλεγμονώδους δράσης. Η δράση αυτή συσχετίσθηκε με το συριγγικό οξύ και τα υδροξυ-κινναμωμικά οξέα, *p*-κουμαρικό και σιναπικό.

Η αντιφλεγμονώδης δράση των αφεψημάτων στα PC3 και HT29 που καταγράφηκε από τη μείωση των επιπέδων της IL-8, δε συσχετίσθηκε με κανένα από τα ποσοτικοποιηθέντα συστατικά τους. Η παρατηρούμενη μείωση στα επίπεδα της IL-8 ήταν ανεξάρτητη της αναστολής των επιπέδων ενεργοποίησης του NF-κB, η οποία συσχετίσθηκε με τα υδροξυ-κινναμωμικά οξέα καθώς και με το ολεανολικό οξύ.

Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων τα φυτοχημικά συστατικά των αφεψημάτων παρουσίασαν χημειοπροστατευτική δράση, αναστέλλοντας την ανάπτυξη των PC3 και HT29 αφορούν στην επαγωγή της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας, στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου ή/και την επαγωγή του κυτταρικού θανάτου με δοσο- και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο. Η αναστολή στην ανάπτυξη των PC3, συσχετίσθηκε με το ροσμαρινικό και το καφεϊκό οξύ καθώς και με τα τερπενικά οξέα, ενώ η δράση των αφεψημάτων στα HT29 συσχετίσθηκε με το *p*-κουμαρικό οξύ.

Η γνωστή εξάρτηση της επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων από τα αντιοξειδωτικά τους συστήματα μπορεί να αξιοποιηθεί για την πρόκληση του κυτταρικού θανάτου μέσω αύξησης του οξειδωτικού στρες πάνω από το όριο τοξικότητας. Με βάση τα παραπάνω, ο υποκείμενος μηχανισμός δράσης που διερευνήθηκε ήταν η αύξηση των ενδοκυττάριων επιπέδων των δραστικών ενώσεων οξυγόνου (ROS) και η μείωση της αντιοξειδωτικής άμυνας των καρκινικών κυττάρων στις δύο κυτταρικές σειρές. Από τη συνολική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι τα αφεψήματα των βοτάνων δεν επάγουν την παραγωγή ROS, αλλά μεταβάλουν τα επίπεδα οξειδωτικού στρες των HT29 και PC3 μέσω της μείωσης της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης (GSH), γεγονός που οδηγεί πιθανά στην πρόκληση κυτταρικού θανάτου μέσω του ενδογενούς μονοπατιού που μεσολαβείται από τα μιτοχόνδρια ή/και του εξωγενούς μονοπατιού που μεσολαβείται από τους υποδοχείς κυτταρικού θανάτου.

4.3 Επίλογος-Προτάσεις για Περαιτέρω Έρευνα

Συμπερασματικά, τα αφεψήματα των βοτάνων της μελέτης περιέχουν φυτοχημικά συστατικά τα οποία δρουν ευεργετικά στην πρόληψη και αντιμετώπιση χρόνιων νοσημάτων, όπως η καρδιαγγειακή νόσος και ο καρκίνος. Σημαντική ήταν η εν δυνάμει δράση των αφεψημάτων έναντι του σχηματισμού αθηρωματικών πλακών, αναστέλλοντας την οξείδωση σημαντικών μορίων που συμμετέχουν τόσο στην έναρξη όσο και στην εξέλιξη της αθηρωματικής διαδικασίας, και συγκεκριμένα των λιποπρωτεϊνών του ορού. Επιπρόσθετα η εκδήλωση αντιφλεγμονώδους δράσης από ορισμένα αφεψήματα επιβεβαιώνει την ευεργετική τους δράση έναντι της αθηρογένεσης. Πρέπει να γίνουν επιπλέον *in vitro* μελέτες για την εκτίμηση των μηχανισμών εκδήλωσης της αντιφλεγμονώδους και πιθανόν προφλεγμονώδους δράσης των αφεψημάτων στα PBMCs, ενώ σημαντική είναι και η εκτίμηση της δράσης τους σε διεγερμένα μακροφάγα και κύτταρα του αγγειακού ενδοθηλίου. Συνεχίζοντας, η επιβεβαίωση της καρδιοπροστατευτικής τους δράσης θα ήταν δυνατή μέσω *in vivo* μελετών, με σκοπό να εκτιμηθεί η βιοδιαθεσιμότητα των συστατικών τους και να αξιολογηθεί η δράση τους, έπειτα από διατροφική παρέμβαση σε υγιείς εθελοντές, φυσικά αφού πρώτα διερευνηθεί η εμφάνιση πιθανών τοξικών παρενεργειών που μπορεί να εμφανιστούν από την πρόσληψή τους.

Σημαντικά ήταν τα ευρήματα από την εκτίμηση της χημειοπροστατευτικής δράσης των αφεψημάτων σε τύπους καρκίνου που σχετίζονται με τη διατροφή, συγκεκριμένα του προστάτη και του παχέος εντέρου. Ειδικότερα, βρέθηκε ότι η παρουσία των αφεψημάτων στις καλλιέργειες των καρκινικών κυττάρων ήταν ικανή να αναστείλει την έκκριση της χημειοκίνης IL-8. Παρόλο που δεν αποσαφηνίσθηκε ο μηχανισμός μέσω του οποίου τα αφεψήματα αναστέλλουν την έκκριση του μορίου, η φυσιολογική σημασία του ευρήματος είναι μεγάλη, καθώς η IL-8 συμμετέχει σε σημαντικά μονοπάτια που σχετίζονται με την εξέλιξη της νόσου, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η αγγειογένεση και η μετάσταση. Η ικανότητα των αφεψημάτων να δρουν ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες ενισχύεται μέσω της αναστολής που σημειώθηκε στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Πρέπει να γίνουν περαιτέρω *in vitro* μελέτες ώστε να επιβεβαιωθεί ότι η επαγωγή της απόπτωσης είναι το προϊόν της επίδρασης που ασκούν τα συστατικά των αφεψημάτων στα αντιοξειδωτικά συστήματα των καρκινικών κυττάρων. Επιπρόσθετα, κρίνεται σημαντική η διερεύνηση των σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στην εκδήλωση των προαναφερθεισών δράσεων καθώς και η εκτίμηση της δράσης τους σε άλλους συσχετιζόμενους με τη διατροφή τύπους καρκίνου.

ΚΕΦΆΛΑΙΟ V : ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abascal, K., Ganora, L., and Yarnell, E. (2005). The effect of freeze-drying and its implications for botanical medicine: a review. Phytotherapy Research *19*, 655-660.

Abd El-Hady, F. K., and El-Shahid, Z. A. (2014). Influence of some culinary plants on the suppression of human low density lipoprotein (LDL) peroxidation (In-vitro). International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research *26*, 209-215.

Adams, M. (2007). Further clarifications on GRS construction [3]. Geosynthetics *25*.

Aggarwal, B. B., and Shishodia, S. (2006). Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. Biochem Pharmacol *71*, 1397-1421.

Aggarwal, B. B., Vijayalekshmi, R., and Sung, B. (2009). Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. Clinical cancer research *15*, 425-430.

Ahmed, I. A., Mikail, M. A., Bin Ibrahim, M., Bin Hazali, N., Rasad, M. S. B. A., Ghani, R. A., Wahab, R. A., Arief, S. J., and Yahya, M. N. A. (2015). Antioxidant activity and phenolic profile of various morphological parts of underutilised Baccaurea angulata fruit. Food Chemistry *172*, 778-787.

Alao, J. P. (2007). The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. Molecular cancer *6*, 1.

Albano, S. M., and Miguel, M. G. (2011). Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. Industrial Crops and Products *33*, 338-343.

Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., and Chinou, I. B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two Origanum species. Journal of agricultural and food chemistry *49*, 4168-4170.

Allen-Hall, L., Cano, P., Arnason, J. T., Rojas, R., Lock, O., and Lafrenie, R. M. (2007). Treatment of THP-1 cells with Uncaria tomentosa extracts differentially regulates the expression if IL-1beta and TNF-alpha. Journal of Ethnopharmacology *109*, 312-317.

Amarowicz, R., Pegg, R., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., and Weil, J. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. Food Chemistry *84*, 551-562.

Anastasiadi, M., Pratsinis, H., Kletsas, D., Skaltsounis, A.-L., and Haroutounian, S. A. (2010). Bioactive non-coloured polyphenols content of grapes, wines and vinification by-products: Evaluation of the antioxidant activities of their extracts. Food Research International *43*, 805-813.

Andjelković, M., Van Camp, J., De Meulenaer, B., Depaemelaere, G., Socaciu, C., Verloo, M., and Verhe, R. (2006). Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. Food Chemistry *98*, 23-31.

Andrade, P., Ferreres, F., and Teresa Amaral, M. (1997). Analysis of honey phenolic acids by HPLC, its application to honey botanical characterization. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies *20*, 2281-2288.

Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., and Ryan, D. (2000). Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. Analyst *125*, 989-1009.

Araújo, J. R., Gonçalves, P., and Martel, F. (2011). Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. Nutrition Research *31*, 77-87.

Aravindaram, K., and Yang, N.-S. (2010). Anti-inflammatory plant natural products for cancer therapy. Planta medica *76*, 1103-1117.

Arceusz, A., and Wesolowski, M. (2013). Quality consistency evaluation of Melissa officinalis L. commercial herbs by HPLC fingerprint and quantitation of selected phenolic acids. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis *83*, 215-220.

Argyropoulou, C., Papadatou, M., Grigoriadou, C., Maloupa, E., and Skaltsa, H. (2014). Evaluation of the Essential Oil Content of Cretan Dittany Cultivated in Northern Greece. Medicinal & Aromatic Plants *2014*.

Arnous, A., Makris, D. P., and Kefalas, P. (2002). Correlation of Pigment and Flavanol Content with Antioxidant Properties in Selected Aged Regional Wines from Greece. Journal of Food Composition and Analysis *15*, 655-665.

Arranz, E., Jaime, L., López de las Hazas, M. C., Reglero, G., and Santoyo, S. (2015). Supercritical fluid extraction as an alternative process to obtain essential oils with anti-inflammatory properties from marjoram and sweet basil. Industrial Crops and Products *67*, 121-129.

Arsenijević, J., Drobac, M., Šoštarić, I., Ražić, S., Milenković, M., Couladis, M., and Maksimović, Z. (2016). Bioactivity of herbal tea of Hungarian thyme based on the composition of volatiles and polyphenolics. Industrial Crops and Products *89*, 14-20.

Arts, I. C. W., Hollman, P. C. H., De Bas Bueno Mesquita, H., Feskens, E. J. M., and Kromhout, D. (2001). Dietary catechins and epithelial cancer incidence: The Zutphen Elderly Study. International journal of cancer *92*, 298-302.

Askun, T., Tekwu, E. M., Satil, F., Modanlioglu, S., and Aydeniz, H. (2013). Preliminary antimycobacterial study on selected Turkish plants (Lamiaceae) against Mycobacterium tuberculosis and search for some phenolic constituents. BMC complementary and alternative medicine *13*, 1.

Athar, M., Back, J. H., Kopelovich, L., Bickers, D. R., and Kim, A. L. (2009). Multiple molecular targets of resveratrol: Anti-carcinogenic mechanisms. Archives of biochemistry and biophysics *486*, 95-102.

Atoui, A. K., Mansouri, A., Boskou, G., and Kefalas, P. (2005). Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. Food Chemistry *89*, 27-36.

Aviram, M., and Fuhrman, B. (2002). Wine Flavonoids Protect against LDL Oxidation and Atherosclerosis. Annals of the New York Academy of Sciences *957*, 146-161.

Bach-Faig, A., Berry, E. M., Lairon, D., Reguant, J., Trichopoulou, A., Dernini, S., Medina, F. X., Battino, M., Belahsen, R., Miranda, G., and Serra-Majem, L. (2011). Mediterranean diet pyramid today. Science and cultural updates. Public Health Nutr *14*, 2274-2284.

Baldwin, A. S. (2001). Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-κB. The Journal of clinical investigation *107*, 241-246.

Barnes, P. M., Bloom, B., and Nahin, R. L. (2008). Complementary and alternative medicine use among adults and children: United States, 2007. Natl Health Stat Report *10*, 1-23.

Barros, L., Dueñas, M., Dias, M. I., Sousa, M. J., Santos-Buelga, C., and Ferreira, I. C. F. R. (2012). Phenolic profiles of in vivo and in vitro grown Coriandrum sativum L. Food Chemistry *132*, 841-848.

Baruah, M. M., Khandwekar, A. P., and Sharma, N. (2016). Quercetin modulates Wnt signaling components in prostate cancer cell line by inhibiting cell viability, migration, and metastases. Tumour Biol *37*, 14025-14034.

Bassolé, I. H. N., and Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. Molecules *17*, 3989-4006.

Basu, A., Das, A. S., Majumder, M., and Mukhopadhyay, R. (2016). Antiatherogenic Roles of Dietary Flavonoids Chrysin, Quercetin, and Luteolin. Journal of cardiovascular pharmacology *68*, 89-96.

Bendif, H., Boudjeniba, M., Djamel Miara, M., Biqiku, L., Bramucci, M., Caprioli, G., Lupidi, G., Quassinti, L., Sagratini, G., Vitali, L. A., *et al.* (2017). Rosmarinus eriocalyx: An alternative to Rosmarinus officinalis as a source of antioxidant compounds. Food Chemistry *218*, 78-88.

Berdowska, I., Zieliński, B., Fecka, I., Kulbacka, J., Saczko, J., and Gamian, A. (2013). Cytotoxic impact of phenolics from Lamiaceae species on human breast cancer cells. Food Chemistry *141*, 1313-1321.

Berker, K. I., Güçlü, K., Tor, İ., and Apak, R. (2007). Comparative evaluation of Fe (III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. Talanta *72*, 1157-1165.

Berkovich, L., Ron, I., Earon, G., Abu-Ghanem, S., Rimmon, A., and Lev-Ari, S. (2012). The role of medicinal herbs with anti-inflammatory properties in prevention and treatment of cancer. Harefuah *151*, 629-632.

Berliner, J. A., and Heinecke, J. W. (1996). The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. Free Radical Biology and Medicine *20*, 707-727.

Berrington, D., and Lall, N. (2012). Anticancer activity of certain herbs and spices on the cervical epithelial carcinoma (HeLa) cell line. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine *2012*.

Borel, F., Lacroix, F. B., and Margolis, R. L. (2002). Prolonged arrest of mammalian cells at the G1/S boundary results in permanent S phase stasis. J Cell Sci *115*, 2829-2838.

Borrás-Linares, I., Stojanović, Z., Quirantes-Piné, R., Arráez-Román, D., Švarc-Gajić, J., Fernández-Gutiérrez, A., and Segura-Carretero, A. (2014). Rosmarinus Officinalis Leaves as a Natural Source of Bioactive Compounds. International Journal of Molecular Sciences *15*, 20585.

Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutrition reviews *56*, 317-333.

Bunel, V., Ouedraogo, M., Nguyen, A. T., Stevigny, C., and Duez, P. (2014). Methods applied to the in vitro primary toxicology testing of natural products: state of the art, strengths, and limits. Planta Med *80*, 1210-1226.

Bush, A. I., and Tanzi, R. E. (2008). Therapeutics for Alzheimer's disease based on the metal hypothesis. Neurotherapeutics *5*, 421-432.

Cai, Y.-Z., Sun, M., Xing, J., Luo, Q., and Corke, H. (2006). Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. Life sciences *78*, 2872-2888.

Cairns, R. A., Harris, I. S., and Mak, T. W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. Nature Reviews Cancer *11*, 85-95.

Call, J. T., Deliargyris, E. N., and Newby, L. K. (2004). Focusing on inflammation in the treatment of atherosclerosis. Cardiol Rev *12*, 194-200.

Calvo, M. I., San Julian, A., and Fernández, M. (1997). Identification of the major compounds in extracts of verbena officinalis l. (Verbenaceae) by HPLC with Post-Column derivatization. Chromatographia *46*, 241-244.

Canadanovic-Brunet, J., Cetkovic, G., Djilas, S., Tumbas, V., Bogdanovic, G., Mandic, A., Markov, S., Cvetkovic, D., and Canadanovic, V. (2008). Radical scavenging, antibacterial, and antiproliferative activities of Melissa officinalis L. extracts. Journal of medicinal food *11*, 133-143.

Čanadanović-Brunet, J., Ćetković, G., Djilas, S., Tumbas, V., Bogdanović, G., Mandić, A., Markov, S., Cvetković, D., and Čanadanović, V. (2008). Radical scavenging, antibacterial, and antiproliferative activities of Melissa officinalis L. extracts. Journal of medicinal food *11*, 133-143.

Capecka, E., Mareczek, A., and Leja, M. (2005). Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. Food Chemistry *93*, 223-226.

Cazzola, R., Camerotto, C., and Cestaro, B. (2011). Anti-oxidant, anti-glycant, and inhibitory activity against α-amylase and α-glucosidase of selected spices and culinary herbs. International journal of food sciences and nutrition *62*, 175-184.

Chen, H.-Y., Lin, Y.-C., and Hsieh, C.-L. (2007). Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. Food Chemistry *104*, 1418-1424.

Cheung, S., and Tai, J. (2007). Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary Rosmarinus officinalis. Oncology reports *17*, 1525-1532.

Cheynier, V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. The American journal of clinical nutrition *81*, 223S-229S.

Collaborators, U. S. B. o. D. (2013). The state of us health, 1990-2010: Burden of diseases, injuries, and risk factors. JAMA *310*, 591-606.

Comalada, M., Ballester, I., Bailon, E., Sierra, S., Xaus, J., Galvez, J., de Medina, F. S., and Zarzuelo, A. (2006). Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure-activity relationship. Biochem Pharmacol *72*, 1010-1021.

Connors, S. K., Chornokur, G., and Kumar, N. B. (2012). New insights into the mechanisms of green tea catechins in the chemoprevention of prostate cancer. Nutrition and Cancer *64*, 4-22.

Cordell, G. A. (2003). Discovering our gifts from nature, now and in the future. Part II. Revista de Quimica *17*, 3-15.

Council, S. S. H. (1999). Dietary quidelines for adults in Greece. In, (Archives of Hellenic Medicine: Ministry of Health and Welfare), pp. 516-524.

Dai, J., and Mumper, R. J. (2010a). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. Molecules *15*, 7313.

Dai, J., and Mumper, R. J. (2010b). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules *15*, 7313-7352.

Dauchet, L., Amouyel, P., and Dallongeville, J. (2005). Fruit and vegetable consumption and risk of stroke a meta-analysis of cohort studies. Neurology *65*, 1193-1197.

Davison, W. (1978). Defining the electroanalytically measured species in a natural water sample. Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry *87*, 395-404.

de Lorgeril, M., Salen, P., Martin, J. L., Monjaud, I., Delaye, J., and Mamelle, N. (1999). Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. Circulation *99*, 779-785.

de Sousa, A. C., Alviano, D. S., Blank, A. F., Barreto Alves, P., Alviano, C. S., and Gattass, C. R. (2004). Melissa officinalis L. essential oil: Antitumoral and antioxidant activities. Journal of Pharmacy and Pharmacology *56*, 677-681.

De Stefani, E., Ronco, A., Mendilaharsu, M., and Deneo-Pellegrini, H. (1999). Diet and risk of cancer of the upper aerodigestive tract - II. Nutrients. Oral Oncology *35*, 22-26.

Degterev, A., Boyce, M., and Yuan, J. (2003). A decade of caspases. Oncogene *22*, 8543-8567.

Dinarello, C. A. (1992). Role of interleukin-1 in infectious diseases. Immunol Rev *127*, 119-146.

Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., and Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chemistry *97*, 654-660.

Dorman, H. D., Bachmayer, O., Kosar, M., and Hiltunen, R. (2004). Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. Journal of agricultural and food chemistry *52*, 762-770.

Duthie, G. G., and Brown, K. M. (1994). Reducing the risk of cardiovascular disease. In Functional Foods, (Springer), pp. 19-38.

Eberhart, C. E., Coffey, R. J., Radhika, A., Giardiello, F. M., Ferrenbach, S., and Dubois, R. N. (1994). Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. Gastroenterology-Orlando *107*, 1183-1188.

Ebrahimnezhad Darzi, S., and Amirghofran, Z. (2013). Dichloromethane fraction of Melissa officinalis induces apoptosis by activation of intrinsic and extrinsic pathways in human leukemia cell lines. Immunopharmacology and Immunotoxicology *35*, 313-320.

Edwards, R. L., Lyon, T., Litwin, S. E., Rabovsky, A., Symons, J. D., and Jalili, T. (2007). Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. The Journal of nutrition *137*, 2405-2411.

Eferl, R., and Wagner, E. F. (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. Nature Reviews Cancer *3*, 859-868.

Egert, S., Bosy-Westphal, A., Seiberl, J., Kurbitz, C., Settler, U., Plachta-Danielzik, S., Wagner, A. E., Frank, J., Schrezenmeir, J., Rimbach, G., *et al.* (2009). Quercetin reduces systolic blood pressure and plasma oxidised low-density lipoprotein concentrations in overweight subjects with a high-cardiovascular disease risk phenotype: a double-blinded, placebo-controlled cross-over study. Br J Nutr *102*, 1065-1074.

Encalada, M. A., Hoyos, K. M., Rehecho, S., Berasategi, I., de Ciriano, M. G.-Í., Ansorena, D., Astiasarán, I., Navarro-Blasco, Í., Cavero, R. Y., and Calvo, M. I. (2011). Anti-proliferative Effect of Melissa officinalis on Human Colon Cancer Cell Line. Plant Foods for Human Nutrition *66*, 328-334.

Exarchou, V., Godejohann, M., Van Beek, T. A., Gerothanassis, I. P., and Vervoort, J. (2003). LC-UV-Solid-Phase Extraction-NMR-MS Combined with a Cryogenic Flow Probe and Its Application to the Identification of Compounds Present in Greek Oregano. Analytical Chemistry *75*, 6288-6294.

Fan, K., Li, X., Cao, Y., Qi, H., Li, L., Zhang, Q., and Sun, H. (2015). Carvacrol inhibits proliferation and induces apoptosis in human colon cancer cells. Anti-cancer drugs *26*, 813-823.

Fardet, A., and Rock, E. (2014). Toward a New Philosophy of Preventive Nutrition: From a Reductionist to a Holistic Paradigm to Improve Nutritional Recommendations. Advances in Nutrition: An International Review Journal *5*, 430-446.

Farnsworth, N. R., Akerele, O., Bingel, A. S., Soejarto, D. D., and Guo, Z. (1985). Medicinal plants in therapy. Bulletin of the World Health Organization *63*, 965-981.

Fasseas, M. K., Mountzouris, K. C., Tarantilis, P. A., Polissiou, M., and Zervas, G. (2008). Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. Food Chemistry *106*, 1188-1194.

Fecka, I., and Turek, S. (2007). Determination of water-soluble polyphenolic compounds in commercial herbal teas from Lamiaceae: peppermint, melissa, and sage. Journal of agricultural and food chemistry *55*, 10908-10917.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer *136*, 9.

Fiamegos, Y. C., Nanos, C. G., Vervoort, J., and Stalikas, C. D. (2004). Analytical procedure for the in-vial derivatization—extraction of phenolic acids and flavonoids in methanolic and aqueous plant extracts followed by gas chromatography with mass-selective detection. Journal of Chromatography A *1041*, 11-18.

Forman, H. J., Davies, K. J., and Ursini, F. (2014). How do nutritional antioxidants really work: nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo. Free Radical Biology and Medicine *66*, 24-35.

Franco, R., and Cidlowski, J. A. (2009). Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. Cell Death Differ *16*, 1303-1314.

Franco, R., Schoneveld, O., Georgakilas, A. G., and Panayiotidis, M. I. (2008). Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. Cancer Lett *266*, 6-11.

Frey, R. S., and Singletary, K. W. (2003). Genistein activates p38 mitogen-activated protein kinase, inactivates ERK1/ERK2 and decreases Cdc25C expression in immortalized human mammary epithelial cells. Journal of Nutrition *133*, 226-231.

Furtado, R. A., Oliveira, B. R., Silva, L. R., Cleto, S. S., Munari, C. C., Cunha, W. R., and Tavares, D. C. (2015). Chemopreventive effects of rosmarinic acid on rat colon carcinogenesis. European Journal of Cancer Prevention *24*, 106-112.

Gülçin, İ. (2006). Antioxidant activity of caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid). Toxicology *217*, 213-220.

García-Segura, L., Pérez-Andrade, M., Miranda-Ríos, J., and Piso, C. (2013). The emerging role of MicroRNAs in the regulation of gene expression by nutrients. Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics *6*, 16-31.

Gautam, R., and Jachak, S. M. (2009). Recent developments in anti-inflammatory natural products. Med Res Rev *29*, 767-820.

Generalić Mekinić, I., Skroza, D., Ljubenkov, I., Šimat, V., Smole Možina, S., and Katalinić, V. (2014). In vitro antioxidant and antibacterial activity of Lamiaceae phenolic extracts: a correlation study. Food Technology and Biotechnology *52*, 119-127.

Georghiou, K., and Delipetrou, P. (2010). Patterns and traits of the endemic plants of Greece. Botanical Journal of the Linnean Society *162*, 130-422.

Ghibelli, L., Coppola, S., Fanelli, C., Rotilio, G., Civitareale, P., Scovassi, A., and Ciriolo, M. (1999). Glutathione depletion causes cytochrome c release even in the absence of cell commitment to apoptosis. The FASEB Journal *13*, 2031-2036.

Ghosh, S., May, M. J., and Kopp, E. B. (1998). NF-κB and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. Annual review of immunology *16*, 225-260.

Gilmore, T. D. (2006). Introduction to NF-κB: players, pathways, perspectives. Oncogene *25*, 6680-6684.

Goldberg, D. M., Tsang, E., Karumanchiri, A., Diamandis, E. P., Soleas, G., and Ng, E. (1996). Method to assay the concentrations of phenolic constituents of biological interest in wines. Analytical Chemistry *68*, 1688-1694.

Goldbohm, R. A., Hertog, M. G. L., Brants, H. A. M., Van Poppel, G., and Van Den Brandt, P. A. (1996). Consumption of black tea and cancer risk: A prospective cohort study. Journal of the National Cancer Institute *88*, 93-100.

González-Tejero, M. R., Casares-Porcel, M., Sánchez-Rojas, C. P., Ramiro-Gutiérrez, J. M., Molero-Mesa, J., Pieroni, A., Giusti, M. E., Censorii, E., de Pasquale, C., Della, A., *et al.* (2008). Medicinal plants in the Mediterranean area: Synthesis of the results of the project Rubia. Journal of Ethnopharmacology *116*, 341-357.

González-Vallinas, M., Molina, S., Vicente, G., Zarza, V., Martín-Hernández, R., García-Risco, M. R., Fornari, T., Reglero, G., and De Molina, A. R. (2014). Expression of microRNA-15b and the glycosyltransferase GCNT3 correlates with antitumor efficacy of Rosemary diterpenes in colon and pancreatic cancer. PloS one *9*, e98556.

Gordaliza, M. (2007). Natural products as leads to anticancer drugs. Clinical and Translational Oncology *9*, 767-776.

Gordon, M. H. (1996). Dietary antioxidants in disease prevention. Natural Product Reports *13*, 265-273.

Gupta, R. A., DuBois, R. N., and Wallace, M. C. (2002). New avenues for the prevention of colorectal cancer: targeting cyclo-oxygenase-2 activity. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology *16*, 945-956.

Gupta, R. A., Wang, D., Katkuri, S., Wang, H., Dey, S. K., and DuBois, R. N. (2004). Activation of nuclear hormone receptor peroxisome proliferator–activated receptor-δ accelerates intestinal adenoma growth. Nature medicine *10*, 245-247.

Gupta, S., Hussain, T., and Mukhtar, H. (2003a). Molecular pathway for (-)-epigallocatechin-3-gallate-induced cell cycle arrest and apoptosis of human prostate carcinoma cells. Archives of biochemistry and biophysics *410*, 177-185.

Gupta, S., Hussain, T., and Mukhtar, H. (2003b). Molecular pathway for (−)-epigallocatechin-3-gallate-induced cell cycle arrest and apoptosis of human prostate carcinoma cells. Archives of biochemistry and biophysics *410*, 177-185.

Gutteridge, J. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clinical chemistry *41*, 1819-1828.

Ha, D. T., Thuong, P. T., and Thuan, N. D. (2014). Protective action of Ampelopsis cantoniensis and its major constituent myricetin against LDL oxidation. Vietnam Journal of Chemistry *45*, 768.

Haddad, J. J., and Abdel-Karim, N. E. (2011). NF-κB cellular and molecular regulatory mechanisms and pathways: therapeutic pattern or pseudoregulation? Cellular immunology *271*, 5-14.

Halliwell, B. (1990). How to characterize a biological antioxidant. Free radical research communications *9*, 1-32.

Halliwell, B. (2007a). Biochemistry of oxidative stress. Biochemical Society Transactions *35*, 1147-1150.

Halliwell, B. (2007b). Oxidative stress and cancer: have we moved forward? Biochemical Journal *401*, 1-11.

Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. Free Radical Biology and Medicine *18*, 125-126.

Han, M., Song, Y., and Zhang, X. (2016). Quercetin Suppresses the Migration and Invasion in Human Colon Cancer Caco-2 Cells Through Regulating Toll-like Receptor 4/Nuclear Factor-kappa B Pathway. Pharmacogn Mag *12*, 0973-1296.

Han, X., Shen, T., and Lou, H. (2007). Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. International Journal of Molecular Sciences *8*, 950.

Handy, D. E., and Loscalzo, J. (2012). Redox regulation of mitochondrial function. Antioxidants & redox signaling *16*, 1323-1367.

Heimler, D., Isolani, L., Vignolini, P., Tombelli, S., and Romani, A. (2007). Polyphenol Content and Antioxidative Activity in Some Species of Freshly Consumed Salads. Journal of Agricultural and Food Chemistry *55*, 1724-1729.

Herrera-Carrera, E., Moreno-Jiménez, M. R., Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., Díaz-Rivas, J. O., Gamboa-Gómez, C. I., and González-Laredo, R. F. (2015). Phenolic composition of selected herbal infusions and their anti-inflammatory effect on a colonic model in vitro in HT-29 cells. Cogent Food & Agriculture *1*, 1059033.

Hess, J., Angel, P., and Schorpp-Kistner, M. (2004). AP-1 subunits: Quarrel and harmony among siblings. Journal of Cell Science *117*, 5965-5973.

Hjartåker, A., Langseth, H., and Weiderpass, E. (2008). Obesity and Diabetes Epidemics. In Innovative Endocrinology of Cancer, L.M. Berstein, and R.J. Santen, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 72-93.

Holst, B., and Williamson, G. (2008). Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. Current opinion in biotechnology *19*, 73-82.

Hsu, C. L., Fang, S. C., and Yen, G. C. (2013). Anti-inflammatory effects of phenolic compounds isolated from the flowers of Nymphaea mexicana Zucc. Food Funct *4*, 1216-1222.

Hu, F. B. (2003). Plant-based foods and prevention of cardiovascular disease: an overview. The American journal of clinical nutrition *78*, 544S-551S.

Huang, D., Ou, B., and Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of agricultural and food chemistry *53*, 1841-1856.

Huang, M. T., Liu, Y., Ramji, D., Lo, C. Y., Ghai, G., Dushenkov, S., and Ho, C. T. (2006). Inhibitory effects of black tea theaflavin derivatives on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation and arachidonic acid metabolism in mouse ears. Mol Nutr Food Res *50*, 115-122.

Hwang, J.-T., Ha, J., Park, I.-J., Lee, S.-K., Baik, H. W., Kim, Y. M., and Park, O. J. (2007). Apoptotic effect of EGCG in HT-29 colon cancer cells via AMPK signal pathway. Cancer Letters *247*, 115-121.

Ibáñez, C., Simó, C., García-Cañas, V., Gómez-Martínez, Á., Ferragut, J. A., and Cifuentes, A. (2012). CE/LC-MS multiplatform for broad metabolomic analysis of dietary polyphenols effect on colon cancer cells proliferation. Electrophoresis *33*, 2328-2336.

Ignat, I., Volf, I., and Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. Food Chemistry *126*, 1821-1835.

Imai, K., Suga, K., and Nakachi, K. (1997). Cancer-preventive effects of drinking green tea among a Japanese population. Preventive Medicine *26*, 769-775.

Ishizawa, K., Yoshizumi, M., Kawai, Y., Terao, J., Kihira, Y., Ikeda, Y., Tomita, S., Minakuchi, K., Tsuchiya, K., and Tamaki, T. (2011). Pharmacology in health food: metabolism of quercetin in vivo and its protective effect against arteriosclerosis. Journal of pharmacological sciences *115*, 466-470.

Itabe, H. (2012). Oxidized low-density lipoprotein as a biomarker of in vivo oxidative stress: from atherosclerosis to periodontitis. Journal of clinical biochemistry and nutrition *51*, 1-8.

Ivanova, D., Gerova, D., Chervenkov, T., and Yankova, T. (2005). Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology *96*, 145-150.

Jaeschke, H. (2011). Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts. Journal of Gastroenterology and Hepatology *26*, 173-179.

Jaganathan, S. K., Supriyanto, E., and Mandal, M. (2013). Events associated with apoptotic effect of p-Coumaric acid in HCT-15 colon cancer cells. World J Gastroenterol *19*, 7726-7734.

Jahanban-Esfahlan, A., Modaeinama, S., Abasi, M., Abbasi, M. M., and Jahanban-Esfahlan, R. (2015). Anti Proliferative Properties of Melissa officinalis in Different Human Cancer Cells. Asian Pac J Cancer Prev *16*, 5703-5707.

Janicke, B., Onning, G., and Oredsson, S. M. (2005). Differential effects of ferulic acid and p-coumaric acid on S phase distribution and length of S phase in the human colonic cell line Caco-2. J Agric Food Chem *53*, 6658-6665.

Jiménez-Zamora, A., Delgado-Andrade, C., and Rufián-Henares, J. A. (2016). Antioxidant capacity, total phenols and color profile during the storage of selected plants used for infusion. Food Chemistry *199*, 339-346.

Jin, S., and Cho, K.-H. (2011). Water extracts of cinnamon and clove exhibits potent inhibition of protein glycation and anti-atherosclerotic activity in vitro and in vivo hypolipidemic activity in zebrafish. Food and Chemical Toxicology *49*, 1521-1529.

Johnson, I. T. (2002). Anticarcinogenic effects of diet-related apoptosis in the colorectal mucosa. Food and Chemical Toxicology *40*, 1171-1178.

Johnson, I. T. (2007). Phytochemicals and cancer. Proceedings of the Nutrition Society *66*, 207-215.

Juránek, I., Nikitovic, D., Kouretas, D., Hayes, A. W., and Tsatsakis, A. M. (2013). Biological importance of reactive oxygen species in relation to difficulties of treating pathologies involving oxidative stress by exogenous antioxidants. Food and Chemical Toxicology *61*, 240-247.

Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J.-P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., and Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. Journal of agricultural and food chemistry *47*, 3954-3962.

Kaliora, A. C., Batzaki, C., Christea, M. G., and Kalogeropoulos, N. (2015). Nutritional evaluation and functional properties of traditional composite salad dishes. LWT - Food Science and Technology *62*, 775-782.

Kaliora, A. C., and Kountouri, A. M. (2012). Chemopreventive Activity of Mediterranean Medicinal Plants. In Cancer Prevention - From Mechanisms to Translational Benefit, A.G. Georgakilas, ed. (InTech).

Kalogeropoulos, N., Konteles, S. J., Troullidou, E., Mourtzinos, I., and Karathanos, V. T. (2009). Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. Food Chemistry *116*, 452-461.

Kalogeropoulos, N., and Tsimidou, M. Z. (2014). Antioxidants in Greek virgin olive oils. Antioxidants *3*, 387-413.

Kalogeropoulos, N., Yanni, A. E., Koutrotsios, G., and Aloupi, M. (2013). Bioactive microconstituents and antioxidant properties of wild edible mushrooms from the island of Lesvos, Greece. Food and Chemical Toxicology *55*, 378-385.

Kalyanaraman, B., Darley-Usmar, V., Davies, K. J. A., Dennery, P. A., Forman, H. J., Grisham, M. B., Mann, G. E., Moore, K., Roberts, L. J., and Ischiropoulos, H. (2012). Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. Free radical biology & medicine *52*, 1-6.

Kanadaswami, C., Lee, L.-T., Lee, P.-P. H., Hwang, J.-J., Ke, F.-C., Huang, Y.-T., and Lee, M.-T. (2005). The antitumor activities of flavonoids. In vivo *19*, 895-909.

Karavoltsos, S., Plavšić, M., Kalogeropoulos, N., Kogiannou, D. A., Strmečki, S., Sakellari, A., Dassenakis, M., and Scoullos, M. (2014). Copper complexing properties and physico-chemical characterisation of the organic matter in Greek herbal infusions. Food Chemistry *160*, 53-60.

Karrasch, T., Kim, J.-S., Jang, B. I., and Jobin, C. (2007). The flavonoid luteolin worsens chemical-induced colitis in NF-κB EGFP transgenic mice through blockade of NF-κB-dependent protective molecules. PloS one *2*, e596.

Karthik, D., Viswanathan, P., and Anuradha, C. V. (2011). Administration of rosmarinic acid reduces cardiopathology and blood pressure through inhibition of p22phox NADPH oxidase in fructose-fed hypertensive rats. Journal of cardiovascular pharmacology *58*, 514-521.

Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., and Jukic, M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. Food Chemistry *94*, 550-557.

Kelly, J. P., Kaufman, D. W., Kelley, K., Rosenberg, L., Anderson, T. E., and Mitchell, A. A. (2005). Recent trends in use of herbal and other natural products. Archives of Internal Medicine *165*, 281-286.

Kerio, L. C., Wachira, F. N., Wanyoko, J. K., and Rotich, M. K. (2012). Characterization of anthocyanins in Kenyan teas: Extraction and identification. Food Chemistry *131*, 31-38.

Keys, A., Menotti, A., Karvonen, M. J., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Djordjevic, B. S., Dontas, A. S., Fidanza, F., Keys, M. H., and et al. (1986). The diet and 15-year death rate in the seven countries study. Am J Epidemiol *124*, 903-915.

Khlebnikov, A. I., Schepetkin, I. A., Domina, N. G., Kirpotina, L. N., and Quinn, M. T. (2007). Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. Bioorganic & medicinal chemistry *15*, 1749-1770.

Khoddami, A., Wilkes, M., and Roberts, T. (2013). Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. Molecules *18*, 2328.

Khokhar, S., and Apenten, R. K. O. (2003). Iron binding characteristics of phenolic compounds: some tentative structure–activity relations. Food Chemistry *81*, 133-140.

Kim, G. D., Park, Y. S., Jin, Y. H., and Park, C. S. (2015). Production and applications of rosmarinic acid and structurally related compounds. Applied Microbiology and Biotechnology *99*, 2083-2092.

Kim, G. T., Lee, S. H., and Kim, Y. M. (2013). Quercetin regulates sestrin 2-AMPK-mTOR signaling pathway and induces apoptosis via increased intracellular ROS in HCT116 colon cancer cells. Journal of cancer prevention *18*, 264-270.

Kim, H. J., Lee, W., and Yun, J. M. (2014). Luteolin inhibits hyperglycemia-induced proinflammatory cytokine production and its epigenetic mechanism in human monocytes. Phytother Res *28*, 1383-1391.

Kim, I.-B., Kim, D.-Y., Lee, S.-J., Sun, M.-J., Lee, M.-S., Li, H., Cho, J.-J., and Park, C.-S. (2006). Inhibition of IL-8 production by green tea polyphenols in human nasal fibroblasts and a549 epithelial cells. Biological and Pharmaceutical Bulletin *29*, 1120-1125.

Kim, W. K., Bang, M. H., Kim, E. S., Kang, N. E., Jung, K. C., Cho, H. J., and Park, J. H. (2005). Quercetin decreases the expression of ErbB2 and ErbB3 proteins in HT-29 human colon cancer cells. The Journal of Nutritional Biochemistry *16*, 155-162.

Kiselova, Y., Ivanova, D., Chervenkov, T., Gerova, D., Galunska, B., and Yankova, T. (2006). Correlation between the in vitro antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Bulgarian herbs. Phytotherapy Research *20*, 961-965.

Klaunig, J. E., Kamendulis, L. M., and Hocevar, B. A. (2010). Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. Toxicologic Pathology *38*, 96-109.

Knekt, P., Kumpulainen, J., Järvinen, R., Rissanen, H., Heliövaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T., and Aromaa, A. (2002). Flavonoid intake and risk of chronic diseases. American Journal of Clinical Nutrition *76*, 560-568.

Kontogianni, V. G., Tomic, G., Nikolic, I., Nerantzaki, A. A., Sayyad, N., Stosic-Grujicic, S., Stojanovic, I., Gerothanassis, I. P., and Tzakos, A. G. (2013). Phytochemical profile of

Rosmarinus officinalis and Salvia officinalis extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. Food Chem *136*, 120-129.

Kostakis, I. K., Tenta, R., Pouli, N., Marakos, P., Skaltsounis, A. L., Pratsinis, H., and Kletsas, D. (2005). Design, synthesis, and antiproliferative activity of some novel aminosubstituted xanthenones, able to overcome multidrug resistance toward MES-SA/Dx5 cells. Bioorg Med Chem Lett *15*, 5057-5060.

Kratchanova, M., Denev, P., Ciz, M., Lojek, A., and Mihailov, A. (2010). Evaluation of antioxidant activity of medicinal plants containing polyphenol compounds. Comparison of two extraction systems. Acta Biochim Pol *57*, 229-234.

Krga, I., Milenkovic, D., Morand, C., and Monfoulet, L. E. (2016). An update on the role of nutrigenomic modulations in mediating the cardiovascular protective effect of fruit polyphenols. Food and Function *7*, 3656-3676.

Kryston, T. B., Georgiev, A. B., Pissis, P., and Georgakilas, A. G. (2011). Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. Mutat Res *711*, 193-201.

Kulisic, T., Krisko, A., Dragovic-Uzelac, V., Milos, M., and Pifat, G. (2007). The effects of essential oils and aqueous tea infusions of oregano (Origanum vulgare L. spp. hirtum), thyme (Thymus vulgaris L.) and wild thyme (Thymus serpyllum L.) on the copper-induced oxidation of human low-density lipoproteins. Int J Food Sci Nutr *58*, 87-93.

Kundu, J. K., Shin, Y. K., and Surh, Y.-J. (2006). Resveratrol modulates phorbol ester-induced pro-inflammatory signal transduction pathways in mouse skin in vivo: NF-κB and AP-1 as prime targets. Biochemical pharmacology *72*, 1506-1515.

Kuo, P. L., and Lin, C. C. (2003). Green tea constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits Hep G2 cell proliferation and induces apoptosis through p53-dependent and fas-mediated pathways. Journal of Biomedical Science *10*, 219-227.

Kurosawa, T., Itoh, F., Nozaki, A., Nakano, Y., Katsuda, S. I., Osakabe, N., Tsubone, H., Kondo, K., and Itakura, H. (2005). Suppressive effects of cacao liquor polyphenols (CLP) on LDL oxidation and the development of atherosclerosis in Kurosawa and Kusanagi-hypercholesterolemic rabbits. Atherosclerosis *179*, 237-246.

Lago, J. H., Toledo-Arruda, A. C., Mernak, M., Barrosa, K. H., Martins, M. A., Tiberio, I. F., and Prado, C. M. (2014). Structure-activity association of flavonoids in lung diseases. Molecules *19*, 3570-3595.

Lambert, J. D., and Elias, R. J. (2010). The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention. Archives of biochemistry and biophysics *501*, 65-72.

Lambert, J. D., and Yang, C. S. (2003). Cancer chemopreventive activity and bioavailability of tea and tea polyphenols. Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis *523-524*, 201-208.

Larrosa, M., Tomás-Barberán, F. A., and Espín, J. C. (2003). Grape polyphenol resveratrol and the related molecule 4-hydroxystilbene induce growth inhibition, apoptosis, S-phase arrest, and upregulation of cyclins A, E, and B1 in human SK-Mel-28 melanoma cells. Journal of agricultural and food chemistry *51*, 4576-4584.

Lazar, B., Katz, A., and Ben-Yaakov, S. (1981). Copper complexing capacity of seawater: A critical appraisal of the direct ASV method. Marine Chemistry *10*, 221-231.

Le Marchand, L., Murphy, S. P., Hankin, J. H., Wilkens, L. R., and Kolonel, L. N. (2000). Intake of flavonoids and lung cancer. Journal of the National Cancer Institute *92*, 154-160.

Lee, C.-J., Chen, L.-G., Chang, T.-L., Ke, W.-M., Lo, Y.-F., and Wang, C.-C. (2011a). The correlation between skin-care effects and phytochemical contents in Lamiaceae plants. Food Chemistry *124*, 833-841.

Lee, H. J., Wang, C. J., Kuo, H. C., Chou, F. P., Jean, L. F., and Tseng, T. H. (2005). Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG2 cells involving mitochondria translocation of Bax/Bak and activation of JNK. Toxicology and Applied Pharmacology *203*, 124-131.

Lee, K. W., Bode, A. M., and Dong, Z. (2011b). Molecular targets of phytochemicals for cancer prevention. Nature Reviews Cancer *11*, 211-218.

Lee, Y., Sung, B., Kang, Y. J., Kim, D. H., Jang, J. Y., Hwang, S. Y., Kim, M., Lim, H. S., Yoon, J. H., Chung, H. Y., and Kim, N. D. (2014). Apigenin-induced apoptosis is enhanced by inhibition of autophagy formation in HCT116 human colon cancer cells. Int J Oncol *44*, 1599-1606.

León-González, A. J., Auger, C., and Schini-Kerth, V. B. (2015). Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy. Biochemical pharmacology *98*, 371-380.

Leyva-López, N., Gutierrez-Grijalva, E. P., Ambriz-Perez, D. L., and Heredia, J. B. (2016). Flavonoids as Cytokine Modulators: A Possible Therapy for Inflammation-Related Diseases. International Journal of Molecular Sciences *17*, 921.

Li, F., Zhang, J., Arfuso, F., Chinnathambi, A., Zayed, M. E., Alharbi, S. A., Kumar, A. P., Ahn, K. S., and Sethi, G. (2015). NF-κB in cancer therapy. Archives of Toxicology *89*, 711-731.

Li, H.-B., Wong, C.-C., Cheng, K.-W., and Chen, F. (2008). Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. LWT-Food Science and Technology *41*, 385-390.

Li, S., Li, S.-K., Gan, R.-Y., Song, F.-L., Kuang, L., and Li, H.-B. (2013). Antioxidant capacities and total phenolic contents of infusions from 223 medicinal plants. Industrial Crops and Products *51*, 289-298.

Lian, T.-W., Wang, L., Lo, Y.-H., Huang, I.-J., and Wu, M.-J. (2008). Fisetin, morin and myricetin attenuate CD36 expression and oxLDL uptake in U937-derived macrophages. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids *1781*, 601-609.

Libby, P. (2012). Inflammation in atherosclerosis. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology *32*, 2045-2051.

Lin, J.-T., Chen, Y.-C., Lee, Y.-C., Rolis Hou, C.-W., Chen, F.-L., and Yang, D.-J. (2012). Antioxidant, anti-proliferative and cyclooxygenase-2 inhibitory activities of ethanolic extracts from lemon balm (Melissa officinalis L.) leaves. LWT - Food Science and Technology *49*, 1-7.

Liolios, C. C., Graikou, K., Skaltsa, E., and Chinou, I. (2010). Dittany of Crete: a botanical and ethnopharmacological review. Journal of Ethnopharmacology *131*, 229-241.

Lippman, S. M., and Hong, W. K. (2002). Cancer Prevention by Delay Commentary re: JA O'Shaughnessy et al., Treatment and Prevention of Intraepithelial Neoplasia: An Important Target for Accelerated New Agent Development. Clin. Cancer Res., 8: 314–346, 2002. Clinical cancer research *8*, 305-313.

Liu, R. H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. The Journal of nutrition *134*, 3479S-3485S.

Lockshin, R. A., and Zakeri, Z. (2004). Apoptosis, autophagy, and more. Int J Biochem Cell Biol *36*, 2405-2419.

Lopaczynski, W., and Zeisel, S. H. (2001). Antioxidants, programmed cell death, and cancer. Nutrition Research *21*, 295-307.

López-Lázaro, M. (2010). A new view of carcinogenesis and an alternative approach to cancer therapy. Mol Med *16*, 144-153.

Lu, P., Ma, J.-q., Li, P., Zhou, H.-m., Xu, X.-m., and Guo, W. (2016). Determination of carnosic acid and carnosol in Rosmarinus officinalis L. by high-performance capillary electrophoresis. Instrumentation Science & Technology, 1-8.

MacFarlane, M., and Williams, A. C. (2004). Apoptosis and disease: A life or death decision. Conference and workshop on apoptosis and disease. EMBO Reports *5*, 674-678.

Manson, M. M. (2003). Cancer prevention - The potential for diet to modulate molecular signalling. Trends in Molecular Medicine *9*, 11-18.

Mantovani, A. (2009). Cancer: inflaming metastasis. Nature *457*, 36-37.

Maraki, M. I., and Sidossis, L. S. (2015). Physiology in Medicine: update on lifestyle determinants of postprandial triacylglycerolemia with emphasis on the Mediterranean lifestyle. American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism *309*, E440.

Maroon, J. C., Bost, J. W., and Maroon, A. (2010). Natural anti-inflammatory agents for pain relief. Surg Neurol Int *1*, 2152-7806.

Marrelli, M., Cristaldi, B., Menichini, F., and Conforti, F. (2015). Inhibitory effects of wild dietary plants on lipid peroxidation and on the proliferation of human cancer cells. Food and Chemical Toxicology *86*, 16-24.

Martin, J. G. P., Porto, E., Corrêa, C. B., Alencar, S., Gloria, E., Cabral, I., and Aquino, L. (2012). Antimicrobial potential and chemical composition of agro-industrial wastes. Journal of Natural Products *5*.

Martínez-González, M. A., Guillén-Grima, F., De Irala, J., Ruíz-Canela, M., Bes-Rastrollo, M., Beunza, J. J., del Burgo, C. L., Toledo, E., Carlos, S., and Sánchez-Villegas, A. (2012). The Mediterranean diet is associated with a reduction in premature mortality among middle-aged adults. The Journal of nutrition *142*, 1672-1678.

Masuda, M., Suzui, M., and Weinstein, I. B. (2001). Effects of epigallocatechin-3-gallate on growth, epidermal growth factor receptor signaling pathways, gene expression, and chemosensitivity in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines. Clinical cancer research *7*, 4220-4229.

Matic, I. Z., Juranic, Z., Savikin, K., Zdunic, G., Nadvinski, N., and Godevac, D. (2013). Chamomile and marigold tea: chemical characterization and evaluation of anticancer activity. Phytother Res *27*, 852-858.

Mechergui, K., Coelho, J. A., Serra, M. C., Lamine, S. B., Boukhchina, S., and Khouja, M. L. (2010). Essential oils of Origanum vulgare L. subsp. glandulosum (Desf.) Ietswaart from Tunisia: chemical composition and antioxidant activity. Journal of the Science of Food and Agriculture *90*, 1745-1749.

Mehta, R. G., Murillo, G., Naithani, R., and Peng, X. (2010). Cancer chemoprevention by natural products: how far have we come? Pharm Res *27*, 950-961.

Mertens-Talcott, S. U., and Percival, S. S. (2005). Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells. Cancer Letters *218*, 141-151.

Mertens-Talcott, S. U., Talcott, S. T., and Percival, S. S. (2003). Low Concentrations of Quercetin and Ellagic Acid Synergistically Influence Proliferation, Cytotoxicity and Apoptosis in MOLT-4 Human Leukemia Cells–. The Journal of nutrition *133*, 2669-2674.

Michels, G., Wätjen, W., Niering, P., Steffan, B., Thi, Q. H. T., Chovolou, Y., Kampkötter, A., Bast, A., Proksch, P., and Kahl, R. (2005). Pro-apoptotic effects of the flavonoid luteolin in rat H4IIE cells. Toxicology *206*, 337-348.

Milner, J. A. (1994). Reducing the risk of cancer. In Functional foods, (Springer), pp. 39-70.

Mira, L., Tereza Fernandez, M., Santos, M., Rocha, R., Helena Florêncio, M., and Jennings, K. R. (2002). Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. Free radical research *36*, 1199-1208.

Mirzoeva, S., Kim, N. D., Chiu, K., Franzen, C. A., Bergan, R. C., and Pelling, J. C. (2008). Inhibition of HIF-1 alpha and VEGF expression by the chemopreventive bioflavonoid apigenin is accompanied by Akt inhibition in human prostate carcinoma PC3-M cells. Molecular carcinogenesis *47*, 686-700.

Modernelli, A., Naponelli, V., Giovanna Troglio, M., Bonacini, M., Ramazzina, I., Bettuzzi, S., and Rizzi, F. (2015). EGCG antagonizes Bortezomib cytotoxicity in prostate cancer cells by an autophagic mechanism. Sci Rep *5*.

Moon, D.-O., Kim, M.-O., Lee, J.-D., Choi, Y. H., and Kim, G.-Y. (2010a). Rosmarinic acid sensitizes cell death through suppression of TNF-α-induced NF-κB activation and ROS generation in human leukemia U937 cells. Cancer Letters *288*, 183-191.

Moon, D. O., Kim, M. O., Lee, J. D., Choi, Y. H., and Kim, G. Y. (2010b). Rosmarinic acid sensitizes cell death through suppression of TNF-α-induced NF-κB activation and ROS generation in human leukemia U937 cells. Cancer Letters *288*, 183-191.

Moon, J.-K., and Shibamoto, T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. Journal of agricultural and food chemistry *57*, 1655-1666.

Moore, J., Yousef, M., and Tsiani, E. (2016). Anticancer Effects of Rosemary (Rosmarinus officinalis L.) Extract and Rosemary Extract Polyphenols. Nutrients *8*.

Moss, J. W., and Ramji, D. P. (2016). Cytokines: roles in atherosclerosis disease progression and potential therapeutic targets. Future Medicinal Chemistry *8*, 1317-1330.

Mothana, R. A., Kriegisch, S., Harms, M., Wende, K., and Lindequist, U. (2011). Assessment of selected Yemeni medicinal plants for their in vitro antimicrobial, anticancer, and antioxidant activities. Pharmaceutical biology *49*, 200-210.

Moul, J. W., Srivastava, S., and Rhim, J. S. (2002). Curcumin down-regulates AR gene expression and activation in prostate cancer cell lines. journal of oncology *21*, 825-830.

Mueller, M., Hobiger, S., and Jungbauer, A. (2010). Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. Food Chemistry *122*, 987-996.

Murray, A. W. (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. Cell *116*, 221-234.

Mut-Salud, N., Álvarez, P. J., Garrido, J. M., Carrasco, E., Aránega, A., and Rodríguez-Serrano, F. (2016). Antioxidant Intake and Antitumor Therapy: Toward Nutritional Recommendations for Optimal Results. Oxidative Medicine and Cellular Longevity *2016*.

Mutoh, M., Takahashi, M., Fukuda, K., Matsushima-Hibiya, Y., Mutoh, H., Sugimura, T., and Wakabayashi, K. (2000). Suppression of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells by chemopreventive agents with a resorcin-type structure. Carcinogenesis *21*, 959-963.

Naczk, M., and Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis *41*, 1523-1542.

Nakachi, K., Suemasu, K., Suga, K., Takeo, T., Imai, K., and Higashi, Y. (1998). Influence of drinking green tea on breast cancer malignancy among Japanese patients. Japanese Journal of Cancer Research *89*, 254-261.

Ness, A. R., and Powles, J. W. (1997). Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: a review. International Journal of epidemiology *26*, 1-13.

Netea, M. G., Simon, A., van de Veerdonk, F., Kullberg, B. J., Van der Meer, J. W., and Joosten, L. A. (2010). IL-1beta processing in host defense: beyond the inflammasomes. PLoS Pathog *6*, 1000661.

Newman, D. J., and Cragg, G. M. (2007). Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. Journal of Natural Products *70*, 461-477.

Neyestani, T. R., Gharavi, A., and Kalayi, A. (2009). Selective effects of tea extract and its phenolic compounds on human peripheral blood mononuclear cell cytokine secretions. Int J Food Sci Nutr *1*, 79-88.

Niebylski, M. L., Redburn, K. A., Duhaney, T., and Campbell, N. R. (2015). Healthy food subsidies and unhealthy food taxation: A systematic review of the evidence. Nutrition *31*, 787-795.

Nöthlings, U., Schulze, M. B., Weikert, C., Boeing, H., van der Schouw, Y. T., Bamia, C., Benetou, V., Lagiou, P., Krogh, V., and Beulens, J. W. (2008). Intake of vegetables, legumes, and fruit, and risk for all-cause, cardiovascular, and cancer mortality in a European diabetic population. The Journal of nutrition *138*, 775-781.

Ocaña-Fuentes, A., Arranz-Gutiérrez, E., Señorans, F. J., and Reglero, G. (2010). Supercritical fluid extraction of oregano (Origanum vulgare) essentials oils: Anti-inflammatory properties based on cytokine response on THP-1 macrophages. Food and Chemical Toxicology *48*, 1568-1575.

Okamura, N., Fujimoto, Y., Kuwabara, S., and Yagi, A. (1994). High-performance liquid chromatographic determination of carnosic acid and carnosol in Rosmarinus officinalis and Salvia officinalis. Journal of Chromatography A *679*, 381-386.

Okoye, F. B., Obonga, W. O., Onyegbule, F. A., Ndu, O. O., and Ihekwereme, C. P. (2014). Chemical composition and anti-inflammatory activity of essential oils from the leaves of Ocimum basilicum L. and Ocimum gratissimum L.(Lamiaceae). International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research *5*, 2174.

Ong, C. S., Tran, E., Nguyen, T.T., Ong, C. K., Lee, S. K., Lee, J. J., and Huynh, H. (2004). Quercetin-induced growth inhibition and cell death in nasopharyngeal carcinoma cells are associated with increase in Bad and hypophosphorylated retinoblastoma expressions. Oncology Reports *11*, 727-733.

Oprean, C., Zambori, C., Borcan, F., Soica, C., Zupko, I., Minorics, R., Bojin, F., Ambrus, R., Muntean, D., Danciu, C., *et al.* (2016). Anti-proliferative and antibacterial in vitro evaluation

of the polyurethane nanostructures incorporating pentacyclic triterpenes. Pharm Biol *54*, 2714-2722.

Oroian, M., and Escriche, I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. Food Research International *74*, 10-36.

Palmer, J. D., Soule, B. P., Simone, B. A., Zaorsky, N. G., Jin, L., and Simone, N. L. (2014). MicroRNA expression altered by diet: Can food be medicinal? Ageing Research Reviews *17*, 16-24.

Pan, M.-H., Ghai, G., and Ho, C.-T. (2008). Food bioactives, apoptosis, and cancer. Molecular Nutrition & Food Research *52*, 43-52.

Panieri, E., and Santoro, M. (2016). ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. Cell Death & Disease *7*, e2253.

Park, E. J., and Pezzuto, J. M. (2002). Botanicals in cancer chemoprevention. Cancer and Metastasis Reviews *21*, 231-255.

Park, S. Y., and Seol, D. W. (2002). Regulation of Akt by EGF-R inhibitors, a possible mechanism of EGF-R inhibitor-enhanced TRAIL-induced apoptosis. Biochemical and Biophysical Research Communications *295*, 515-518.

Patel, B., Shah, V. R., and Bavadekar, S. A. (2012). Anti-proliferative effects of carvacrol on human prostate cancer cell line, LNCaP. The FASEB Journal *26*, 1037.1035.

Paur, I., Austenaa, L. M., and Blomhoff, R. (2008). Extracts of dietary plants are efficient modulators of nuclear factor kappa B. Food and Chemical Toxicology *46*, 1288-1297.

Pearson, D. A., Frankel, E. N., Aeschbach, R., and German, J. B. (1997). Inhibition of endothelial cell-mediated oxidation of low-density lipoprotein by rosemary and plant phenolics. Journal of agricultural and food chemistry *45*, 578-582.

Peng, C., Su, J., Chyau, C., Sung, T., Ho, S., Peng, C., and Peng, R. (2007). Supercritical fluid extracts of rosemary [Rosemarinus officinalis] leaves exhibit potent anti-inflammation and anti-tumor effects. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry (Japan).

Peng, W., Wu, J. G., Jiang, Y. B., Liu, Y. J., Sun, T., Wu, N., and Wu, C. J. (2015). Antitumor activity of 4-O-(2"-O-acetyl-6"-O-p-coumaroyl-beta-D-glucopyranosyl)-p-coumaric acid against lung cancers via mitochondrial-mediated apoptosis. Chem Biol Interact *233*, 8-13.

Percival, S. S., Vanden Heuvel, J. P., Nieves, C. J., Montero, C., Migliaccio, A. J., and Meadors, J. (2012). Bioavailability of herbs and spices in humans as determined by ex vivo inflammatory suppression and DNA strand breaks. J Am Coll Nutr *31*, 288-294.

Pérez-Jiménez, J., Neveu, V., Vos, F., and Scalbert, A. (2010). Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. European journal of clinical nutrition *64*, S112-S120.

Petrovska, B. B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. Pharmacognosy Reviews *6*, 1-5.

Porath, D., Riegger, C., Drewe, J., and Schwager, J. (2005). Epigallocatechin-3-gallate impairs chemokine production in human colon epithelial cell lines. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics *315*, 1172-1180.

Pradeep, P., and Sreerama, Y. N. (2015). Impact of processing on the phenolic profiles of small millets: Evaluation of their antioxidant and enzyme inhibitory properties associated with hyperglycemia. Food Chemistry *169*, 455-463.

Prieto, J. M., Iacopini, P., Cioni, P., and Chericoni, S. (2007). In vitro activity of the essential oils of Origanum vulgare, Satureja montana and their main constituents in peroxynitrite-induced oxidative processes. Food Chemistry *104*, 889-895.

Proestos, C., Boziaris, I., Nychas, G.-J., and Komaitis, M. (2006). Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. Food Chemistry *95*, 664-671.

PubMed (2016). Determination of Cytotoxicity. Prog Drug Res *71*, 159-161.

Ramji, D. P., and Davies, T. S. (2015). Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. Cytokine & Growth Factor Reviews *26*, 673-685.

Ramos, S. (2007). Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. The Journal of Nutritional Biochemistry *18*, 427-442.

Ramos, S. (2008). Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. Molecular Nutrition & Food Research *52*, 507-526.

Rao, P. S., Satelli, A., Moridani, M., Jenkins, M., and Rao, U. S. (2012). Luteolin induces apoptosis in multidrug resistant cancer cells without affecting the drug transporter function: Involvement of cell line-specific apoptotic mechanisms. International journal of cancer *130*, 2703-2714.

Reed, T. T. (2011). Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. Free Radical Biology and Medicine *51*, 1302-1319.

Reuter, S., Eifes, S., Dicato, M., Aggarwal, B. B., and Diederich, M. (2008). Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. Biochemical pharmacology *76*, 1340-1351.

Ribeiro, D., Freitas, M., Tome, S. M., Silva, A. M., Laufer, S., Lima, J. L., and Fernandes, E. (2015a). Flavonoids inhibit COX-1 and COX-2 enzymes and cytokine/chemokine production in human whole blood. Inflammation *38*, 858-870.

Ribeiro, D., Freitas, M., Tomé, S. M., Silva, A. M. S., Laufer, S., Lima, J. L. F. C., and Fernandes, E. (2015b). Flavonoids Inhibit COX-1 and COX-2 Enzymes and Cytokine/Chemokine Production in Human Whole Blood. Inflammation *38*, 858-870.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., and Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology and Medicine *20*, 933-956.

Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A.-H., and Khalel, K. I. (2013). Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (Thymus vulgaris L.), sage (Salvia officinalis L.), and marjoram (Origanum majorana L.) extracts. Industrial Crops and Products *43*, 827-831.

Rodrigues, M. J., Neves, V., Martins, A., Rauter, A. P., Neng, N. R., Nogueira, J. M. F., Varela, J., Barreira, L., and Custódio, L. (2016). In vitro antioxidant and anti-inflammatory properties of Limonium algarvense flowers' infusions and decoctions: A comparison with green tea (Camellia sinensis). Food Chemistry *200*, 322-329.

Romier, B., Van De Walle, J., During, A., Larondelle, Y., and Schneider, Y.-J. (2008). Modulation of signalling nuclear factor-κB activation pathway by polyphenols in human intestinal Caco-2 cells. British Journal of Nutrition *100*, 542-551.

Ruiz-Núñez, B., Pruimboom, L., Dijck-Brouwer, D. A. J., and Muskiet, F. A. J. (2013). Lifestyle and nutritional imbalances associated with Western diseases: causes and consequences of chronic systemic low-grade inflammation in an evolutionary context. The Journal of Nutritional Biochemistry *24*, 1183-1201.

Russo, M., Spagnuolo, C., Tedesco, I., Bilotto, S., and Russo, G. L. (2012). The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. Biochemical pharmacology *83*, 6-15.

Ružić, I. (1982). Theoretical aspects of the direct titration of natural waters and its information yield for trace metal speciation. Analytica Chimica Acta *140*, 99-113.

Saddiqe, Z., Naeem, I., and Maimoona, A. (2010). A review of the antibacterial activity of Hypericum perforatum L. Journal of Ethnopharmacology *131*, 511-521.

Saenglee, S., Jogloy, S., Patanothai, A., Leid, M., and Senawong, T. (2016). Cytotoxic effects of peanut phenolics possessing histone deacetylase inhibitory activity in breast and cervical cancer cell lines. Pharmacol Rep *68*, 1102-1110.

Samanidou, V., Tsagiannidis, A., and Sarakatsianos, I. (2012). Simultaneous determination of polyphenols and major purine alkaloids in Greek Sideritis species, herbal extracts, green tea, black tea, and coffee by high-performance liquid chromatography-diode array detection. Journal of Separation Science *35*, 608-615.

Sánchez-Quesada, C., López-Biedma, A., Warleta, F., Campos, M., Beltrán, G., and Gaforio, J. J. (2013). Bioactive properties of the main triterpenes found in olives, virgin olive oil, and leaves of Olea europaea. Journal of agricultural and food chemistry *61*, 12173-12182.

Sánchez-Vioque, R., Polissiou, M., Astraka, K., De Los Mozos-Pascual, M., Tarantilis, P., Herraiz-Peñalver, D., and Santana-Méridas, O. (2013). Polyphenol composition and antioxidant and metal chelating activities of the solid residues from the essential oil industry. Industrial Crops and Products *49*, 150-159.

Sanders, K., Moran, Z., Shi, Z., Paul, R., and Greenlee, H. (2016). Natural Products for Cancer Prevention: Clinical Update 2016. Seminars in Oncology Nursing *32*, 215-240.

Saraydin, S. U., Tuncer, E., Tepe, B., Karadayi, S., Özer, H., Şen, M., Karadayi, K., Inan, D., Elagöz, Ş., Polat, Z., *et al.* (2012). Antitumoral effects of melissa officinalis on breast cancer in vitro and in vivo. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention *13*, 2765-2770.

Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., Sugawara, M., and Iseki, K. (2011). In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. International Journal of Pharmaceutics *403*, 136-138.

Savini, I., Arnone, R., Catani, M. V., and Avigliano, L. (2009). Origanum Vulgare Induces Apoptosis in Human Colon Cancer Caco2 Cells. Nutrition and Cancer *61*, 381-389.

Scalbert, A., Johnson, I. T., and Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. The American journal of clinical nutrition *81*, 215S-217S.

Selvendiran, K., Koga, H., Ueno, T., Yoshida, T., Maeyama, M., Torimura, T., Yano, H., Kojiro, M., and Sata, M. (2006). Luteolin promotes degradation in signal transducer and activator of transcription 3 in human hepatoma cells: An implication for the antitumor potential of flavonoids. Cancer research *66*, 4826-4834.

Sentkowska, A., Biesaga, M., and Pyrzynska, K. (2016). Effects of brewing process on phenolic compounds and antioxidant activity of herbs. Food Science and Biotechnology *25*, 965-970.

Shadkami, F., Estevez, S., and Helleur, R. (2009). Analysis of catechins and condensed tannins by thermally assisted hydrolysis/methylation-GC/MS and by a novel two step methylation. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis *85*, 54-65.

Shahrzad, S., and Bitsch, I. (1996). Determination of some pharmacologically active phenolic acids in juices by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A *741*, 223-231.

Shan, B., Cai, Y. Z., Sun, M., and Corke, H. (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. Journal of agricultural and food chemistry *53*, 7749-7759.

Shimizu, M., Deguchi, A., Lim, J. T. E., Moriwaki, H., Kopelovich, L., and Weinstein, I. B. (2005). (-)-Epigallocatechin gallate and polyphenon E inhibit growth and activation of the epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor-2 signaling pathways in human colon cancer cells. Clinical cancer research *11*, 2735-2746.

Shin, H. Y., Kim, S. H., Jeong, H. J., Kim, S. Y., Shin, T. Y., Um, J. Y., Hong, S. H., and Kim, H. M. (2007). Epigallocatechin-3-gallate inhibits secretion of TNF-alpha, IL-6 and IL-8 through the attenuation of ERK and NF-kappaB in HMC-1 cells. Int Arch Allergy Immunol *142*, 335-344.

Shin, S. Y., Woo, Y., Hyun, J., Yong, Y., Koh, D., Lee, Y. H., and Lim, Y. (2011). Relationship between the structures of flavonoids and their NF-κB-dependent transcriptional activities. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters *21*, 6036-6041.

Shishodia, S., and Aggarwal, B. B. (2004). Nuclear factor-κB: a friend or a foe in cancer? Biochemical pharmacology *68*, 1071-1080.

Shukla, S., Kanwal, R., Shankar, E., Datt, M., Chance, M. R., Fu, P., MacLennan, G. T., and Gupta, S. (2015). Apigenin blocks IKKalpha activation and suppresses prostate cancer progression. Oncotarget *6*, 31216-31232.

Shyu, M. H., Kao, T. C., and Yen, G. C. (2010). Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in HuH7 human hepatocellular carcinoma cells through a mitochondrial-dependent pathway and downregulation of XIAP. J Agric Food Chem *58*, 6110-6118.

Siddiqui, I. A., Adhami, V. M., Afaq, F., Ahmad, N., and Mukhtar, H. (2004). Modulation of phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B- and mitogen-activated protein kinase-pathways by tea polyphenols in human prostate cancer cells. Journal of Cellular Biochemistry *91*, 232-242.

Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Experimental physiology *82*, 291-295.

Silva, A. M. d. O., Andrade-Wartha, E. R. S. d., Carvalho, E. B. T. d., Lima, A. d., Novoa, A. V., and Mancini-Filho, J. (2011). Effect of aqueous rosemary extract (Rosmarinus officinalis L.) on the oxidative stress of diabetic rats. Revista de Nutrição *24*, 121-130.

Singh, M., Bhui, K., Singh, R., and Shukla, Y. (2013). Tea polyphenols enhance cisplatin chemosensitivity in cervical cancer cells via induction of apoptosis. Life sciences *93*, 7-16.

Singh, R., Singh, B., Singh, S., Kumar, N., Kumar, S., and Arora, S. (2008). Anti-free radical activities of kaempferol isolated from Acacia nilotica (L.) Willd. Ex. Del. Toxicology in vitro *22*, 1965-1970.

Sinicrope, F. A., and Gill, S. (2004). Role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer. Cancer and Metastasis Reviews *23*, 63-75.

Siti, H. N., Kamisah, Y., and Kamsiah, J. (2015). The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). Vascular pharmacology *71*, 40-56.

Skotti, E., Anastasaki, E., Kanellou, G., Polissiou, M., and Tarantilis, P. A. (2014). Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants. Industrial Crops and Products *53*, 46-54.

Sofi, F., Macchi, C., Abbate, R., Gensini, G. F., and Casini, A. (2013). Mediterranean diet and health. BioFactors *39*, 335-342.

Soleas, G. J., Diamandis, E. P., Karumanchiri, A., and Goldberg, D. M. (1997). A Multiresidue Derivatization Gas Chromatographic Assay for Fifteen Phenolic Constituents with Mass Selective Detection. Analytical Chemistry *69*, 4405-4409.

Soobrattee, M. A., Bahorun, T., and Aruoma, O. I. (2006). Chemopreventive actions of polyphenolic compounds in cancer. BioFactors *27*, 19-35.

Sotiropoulou, N.-S. D., Kokkini, M. K., Megremi, S.-F. P., Daferera, D. J., Skotti, E. P., and Kimbaris, A. C. (2016). Determination of A-and B-Thujone in Wormwood and Sage Infusions of Greek Flora and Estimation of their Average Toxicity. Current Research in Nutrition and Food Science Journal *4*, 152-160.

Spagnuolo, C., Russo, M., Bilotto, S., Tedesco, I., Laratta, B., and Russo, G. L. (2012). Dietary polyphenols in cancer prevention: the example of the flavonoid quercetin in leukemia. Annals of the New York Academy of Sciences *1259*, 95-103.

Spencer, J. P. E., Rice-Evans, C., and Williams, R. J. (2003). 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. Journal of Biological Chemistry *278*, 34783-34793.

Sporn, M. B. (1976). Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. Cancer research *36*, 2699-2702.

Srivastava, J., Lambert, J., and Vietmeyer, N. (1996). Medicinal plants : an expanding role in development., Vol 1, (World Bank technical paper).

Stagos, D., Portesis, N., Spanou, C., Mossialos, D., Aligiannis, N., Chaita, E., Panagoulis, C., Reri, E., Skaltsounis, L., and Tsatsakis, A. M. (2012). Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. Food and Chemical Toxicology *50*, 4115-4124.

Steele, V. E., Kelloff, G. J., Balentine, D., Boone, C. W., Mehta, R., Bagheri, D., Sigman, C. C., Zhu, S., and Sharma, S. (2000). Comparative chemopreventive mechanisms of green tea, black tea and selected polyphenol extracts measured by in vitro bioassays. Carcinogenesis *21*, 63-67.

Steward, W., and Brown, K. (2013). Cancer chemoprevention: a rapidly evolving field. British journal of cancer *109*, 1-7.

Suganuma, M., Kuzuhara, T., Yamaguchi, K., and Fujiki, H. (2006). Carcinogenic role of tumor necrosis factor-α inducing protein of Helicobacter pylori in human stomach. BMB Reports *39*, 1-8.

Suzuki, K., Koike, H., Matsui, H., Ono, Y., Hasumi, M., Nakazato, H., Okugi, H., Sekine, Y., Oki, K., and Ito, K. (2002). Genistein, a soy isoflavone, induces glutathione peroxidase in the human prostate cancer cell lines LNCaP and PC-3. International journal of cancer *99*, 846-852.

Suzuki, T., Murakami, M., Onai, N., Fukuda, E., Hashimoto, Y., Sonobe, M. H., Kameda, T., Ichinose, M., Miki, K., and Iba, H. (1994). Analysis of AP-1 function in cellular transformation pathways. Journal of Virology *68*, 3527-3535.

Taamalli, A., Arráez-Román, D., Abaza, L., Iswaldi, I., Fernández-Gutiérrez, A., Zarrouk, M., and Segura-Carretero, A. (2015). LC-MS-based metabolite profiling of methanolic extracts from the medicinal and aromatic species Mentha pulegium and Origanum majorana. Phytochemical Analysis *26*, 320-330.

Tai, J., Cheung, S., Wu, M., and Hasman, D. (2012). Antiproliferation effect of Rosemary (Rosmarinus officinalis) on human ovarian cancer cells in vitro. Phytomedicine *19*, 436-443.

Tammen, S. A., Friso, S., and Choi, S.-W. (2013). Epigenetics: The link between nature and nurture. Molecular Aspects of Medicine *34*, 753-764.

Tapsell, L. C., Hemphill, I., Cobiac, L., Patch, C. S., Sullivan, D. R., Fenech, M., Roodenrys, S., Keogh, J. B., Clifton, P. M., Williams, P. G., *et al.* (2006). Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future. The Medical journal of Australia *185*, S4-24.

Teissedre, P., and Waterhouse, A. (2000). Inhibition of oxidation of human low-density lipoproteins by phenolic substances in different essential oils varieties. Journal of agricultural and food chemistry *48*, 3801-3805.

Tosato, G., and Jones, K. D. (1990). Interleukin-1 induces interleukin-6 production in peripheral blood monocytes. Blood *75*, 1305-1310.

Touaibia, M., Jean-François, J., and Doiron, J. (2011). Caffeic acid, a versatile pharmacophore: An overview. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry *11*, 695-713.

Trevisanato, S. I., and Kim, Y. I. (2000). Tea and health. Nutrition reviews *58*, 1-10.

Trichopoulou, A., and Vasilopoulou, E. (2000). Mediterranean diet and longevity. Br J Nutr *84*, S205-209.

Trivellini, A., Lucchesini, M., Maggini, R., Mosadegh, H., Villamarin, T. S. S., Vernieri, P., Mensuali-Sodi, A., and Pardossi, A. (2016). Lamiaceae phenols as multifaceted compounds: bioactivity, industrial prospects and role of “positive-stress”. Industrial Crops and Products *83*, 241-254.

Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. Nutrients *2*, 1231.

Tsao, R., and Deng, Z. (2004). Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. Journal of chromatography B *812*, 85-99.

Tsilidis, K. K., Papadimitriou, N., Capothanassi, D., Bamia, C., Benetou, V., Jenab, M., Freisling, H., Kee, F., Nelen, A., O'Doherty, M. G., *et al.* (2016). Burden of Cancer in a Large Consortium of Prospective Cohorts in Europe. Journal of the National Cancer Institute *108*.

Vagionas, K., Graikou, K., Ngassapa, O., Runyoro, D., and Chinou, I. (2007). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of three Satureja species growing in Tanzania. Food Chemistry *103*, 319-324.

Vallverdú-Queralt, A., Regueiro, J., Martínez-Huélamo, M., Rinaldi Alvarenga, J. F., Leal, L. N., and Lamuela-Raventos, R. M. (2014). A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: Rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay. Food Chemistry *154*, 299-307.

van Erk, M. J., Roepman, P., van der Lende, T. R., Stierum, R. H., Aarts, J., van Bladeren, P. J., and van Ommen, B. (2005). Integrated assessment by multiple gene expression analysis of quercetin bioactivity on anticancer–related mechanisms in colon cancer cells in vitro. European journal of nutrition *44*, 143-156.

Velderrain-Rodríguez, G., Palafox-Carlos, H., Wall-Medrano, A., Ayala-Zavala, J., Chen, C. O., Robles-Sánchez, M., Astiazaran-García, H., Alvarez-Parrilla, E., and González-Aguilar, G. (2014). Phenolic compounds: their journey after intake. Food & function *5*, 189-197.

Vendramini-Costa, D. B., and Carvalho, J. E. (2012). Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. Current Pharmaceutical Design *18*, 3831-3852.

Venkatachalam, K., Gunasekaran, S., and Namasivayam, N. (2016). Biochemical and molecular mechanisms underlying the chemopreventive efficacy of rosmarinic acid in a rat colon cancer. European Journal of Pharmacology *791*, 37-50.

Vladimir-Knezevic, S., Blazekovic, B., Kindl, M., Vladic, J., Lower-Nedza, A. D., and Brantner, A. H. (2014). Acetylcholinesterase inhibitory, antioxidant and phytochemical properties of selected medicinal plants of the lamiaceae family. Molecules *19*, 767-782.

Vos, T., Flaxman, A. D., Naghavi, M., Lozano, R., Michaud, C., Ezzati, M., Shibuya, K., Salomon, J. A., Abdalla, S., Aboyans, V., *et al.* (2012). Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. The Lancet *380*, 2163-2196.

Wang, I. K., Lin-Shiau, S. Y., and Lin, J. K. (1999). Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. European Journal of Cancer *35*, 1517-1525.

Wang, Y., Tang, Y., Liu, C., Shi, C., and Zhang, Y. (2016). Determination and isolation of potential α-glucosidase and xanthine oxidase inhibitors from Trifolium pratense L. by ultrafiltration liquid chromatography and high-speed countercurrent chromatography. Medicinal Chemistry Research *25*, 1020-1029.

Waseem, R., and Low, K. H. (2015). Advanced analytical techniques for the extraction and characterization of plant-derived essential oils by gas chromatography with mass spectrometry. J Sep Sci *38*, 483-501.

Watson, W. H., Cai, J., and Jones, D. P. (2000). Diet and apoptosis. Annual review of nutrition *20*, 485-505.

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

Weissig, V. (2003). Mitochondrial-targeted drug and DNA delivery. Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems *20*.

WHO, W. H. O. (2016). Cardiovascular diseases (CVDs) Fact sheet N 317. Updated January 2015. In.

Wiemann, J., Heller, L., and Csuk, R. (2016). Targeting cancer cells with oleanolic and ursolic acid derived hydroxamates. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters *26*, 907-909.

Williams, R. J., Spencer, J. P., and Rice-Evans, C. (2004). Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? Free Radical Biology and Medicine *36*, 838-849.

Wojdyło, A., Oszmiański, J., and Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. Food Chemistry *105*, 940-949.

Wolter, F., Akoglu, B., Clausnitzer, A., and Stein, J. (2001). Downregulation of the cyclin D1/Cdk4 complex occurs during resveratrol-induced cell cycle arrest in colon cancer cell lines. J Nutr *131*, 2197-2203.

Wong, P. M., Chugn, S. W., and Sultzer, B. M. (2000). Genes, receptors, signals and responses to lipopolysaccharide endotoxin. Scand J Immunol *51*, 123-127.

Wong, S. P., Leong, L. P., and Koh, J. H. W. (2006). Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. Food Chemistry *99*, 775-783.

Wu, J., Zhu, Y., Li, F., Zhang, G., Shi, J., Ou, R., Tong, Y., Liu, Y., Liu, L., Lu, L., and Liu, Z. (2016). Spica prunellae and its marker compound rosmarinic acid induced the expression of efflux transporters through activation of Nrf2-mediated signaling pathway in HepG2 cells. Journal of Ethnopharmacology *193*, 1-11.

Yamakoshi, J., Kataoka, S., Koga, T., and Ariga, T. (1999). Proanthocyanidin-rich extract from grape seeds attenuates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. Atherosclerosis *142*, 139-149.

Yang, C. S., Landau, J. M., Huang, M.-T., and Newmark, H. L. (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. Annual review of nutrition *21*, 381-406.

Yang, C. S., Wang, X., Lu, G., and Picinich, S. C. (2009). Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. Nat Rev Cancer *9*, 429-439.

Yang, L., Liu, Y., Wang, M., Qian, Y., Dong, X., Gu, H., Wang, H., Guo, S., and Hisamitsu, T. (2016). Quercetin-induced apoptosis of HT-29 colon cancer cells via inhibition of the Akt-CSN6-Myc signaling axis. Mol Med Rep *14*, 4559-4566.

Yang, Y., Karakhanova, S., Werner, J., and V Bazhin, A. (2013). Reactive oxygen species in cancer biology and anticancer therapy. Current medicinal chemistry *20*, 3677-3692.

Yeh, C.-C., Kao, S.-J., Lin, C.-C., Wang, S.-D., Liu, C.-J., and Kao, S.-T. (2007). The immunomodulation of endotoxin-induced acute lung injury by hesperidin in vivo and in vitro. Life sciences *80*, 1821-1831.

Yesil-Celiktas, O., Sevimli, C., Bedir, E., and Vardar-Sukan, F. (2010). Inhibitory effects of rosemary extracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines. Plant Foods for Human Nutrition *65*, 158-163.

Yi, W., Fischer, J., Krewer, G., and Akoh, C. C. (2005). Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. Journal of agricultural and food chemistry *53*, 7320-7329.

Yi, W., and Wetzstein, H. Y. (2011). Anti-tumorigenic activity of five culinary and medicinal herbs grown under greenhouse conditions and their combination effects. Journal of the Science of Food and Agriculture *91*, 1849-1854.

Yin, F., Giuliano, A. E., Law, R. E., and Van Herle, A. J. (2001). Apigenin inhibits growth and induces G2/M arrest by modulating cyclin-CDK regulators and ERK MAP kinase activation in breast carcinoma cells. Anticancer Research *21*, 413-420.

Yoo, K. M., Lee, C. H., Lee, H., Moon, B., and Lee, C. Y. (2008). Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. Food Chemistry *106*, 929-936.

Yun, J. M., Afaq, F., Khan, N., and Mukhtar, H. (2009). Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, induces apoptosis and cell cycle arrest in human colon cancer HCT116 cells. Molecular carcinogenesis *48*, 260-270.

Zeng, H.-H., Tu, P.-F., Zhou, K., Wang, H., Wang, B.-H., and Lu, J.-F. (2001). Antioxidant properties of phenolic diterpenes from Rosmarinus officinalis. Acta Pharmacologica Sinica *22*, 1094-1098.

Zgórka, G., and Glowniak, K. (2001). Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis *26*, 79-87.

Zhang, B., Deng, Z., Ramdath, D. D., Tang, Y., Chen, P. X., Liu, R., Liu, Q., and Tsao, R. (2015a). Phenolic profiles of 20 Canadian lentil cultivars and their contribution to antioxidant activity and inhibitory effects on α-glucosidase and pancreatic lipase. Food Chemistry *172*, 862-872.

Zhang, M., Lee, A. H., Binns, C. W., and Xie, X. (2004). Green tea consumption enhances survival of epithelial ovarian cancer. International journal of cancer *112*, 465-469.

Zhang, X. A., Zhang, S., Yin, Q., and Zhang, J. (2015b). Quercetin induces human colon cancer cells apoptosis by inhibiting the nuclear factor-kappa B Pathway. Pharmacogn Mag *11*, 404-409.

Zhao, B. (2009). Natural antioxidants protect neurons in Alzheimer's disease and parkinson's disease. Neurochemical Research *34*, 630-638.

Zheng, W., and Wang, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. Journal of agricultural and food chemistry *49*, 5165-5170.

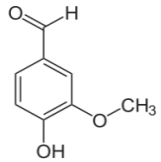
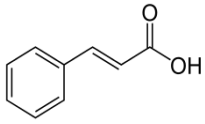
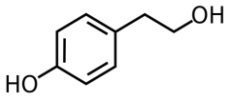
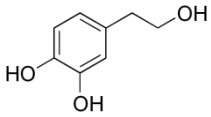
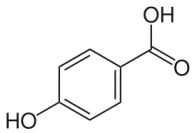
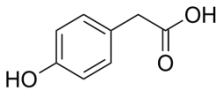
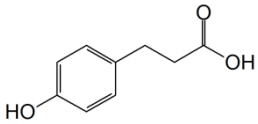
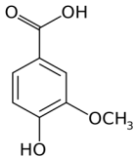
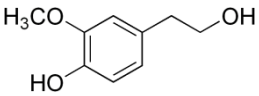
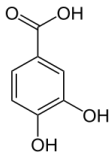
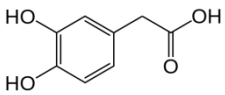
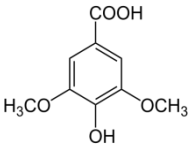
Zhu, F., Asada, T., Sato, A., Koi, Y., Nishiwaki, H., and Tamura, H. (2014). Rosmarinic acid extract for antioxidant, antiallergic, and α-glucosidase inhibitory activities, isolated by supramolecular technique and solvent extraction from Perilla leaves. Journal of agricultural and food chemistry *62*, 885-892.

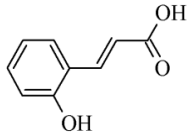
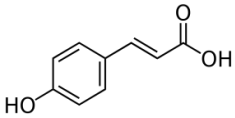
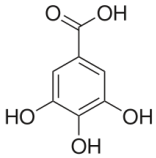
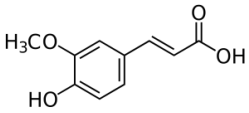
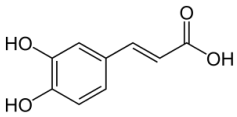
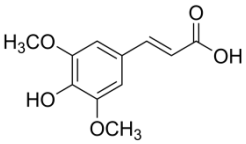
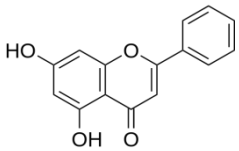
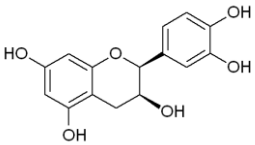
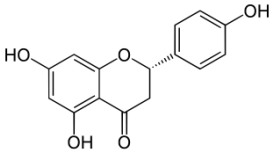
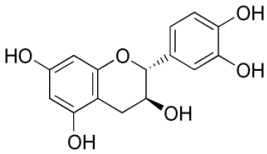
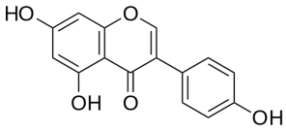
Ziegler, D. S., and Kung, A. L. (2008). Therapeutic targeting of apoptosis pathways in cancer. Current Opinion in Oncology *20*, 97-103.

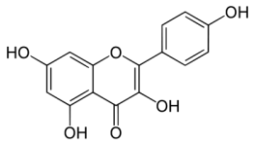
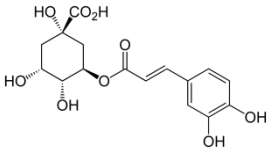
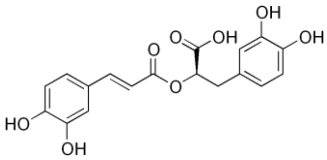
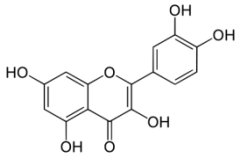
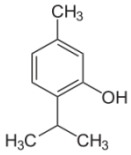
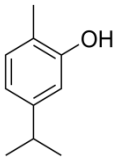
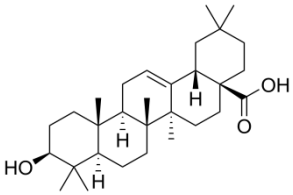
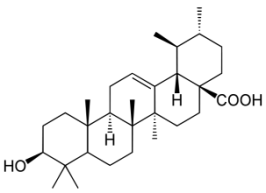
Zunino, S. J., Peerson, J. M., Freytag, T. L., Breksa, A. P., Bonnel, E. L., Woodhouse, L. R., and Storms, D. H. (2014). Dietary grape powder increases IL-1beta and IL-6 production by lipopolysaccharide-activated monocytes and reduces plasma concentrations of large LDL and large LDL-cholesterol particles in obese humans. Br J Nutr *112*, 369-380.

Zunino, S. J., Storms, D. H., Freytag, T. L., Mackey, B. E., Zhao, L., Gouffon, J. S., and Hwang, D. H. (2013). Dietary strawberries increase the proliferative response of CD3/CD28-activated CD8+ T cells and the production of TNF-α in lipopolysaccharide-stimulated monocytes from obese human subjects. British Journal of Nutrition *110*, 2011-2019.

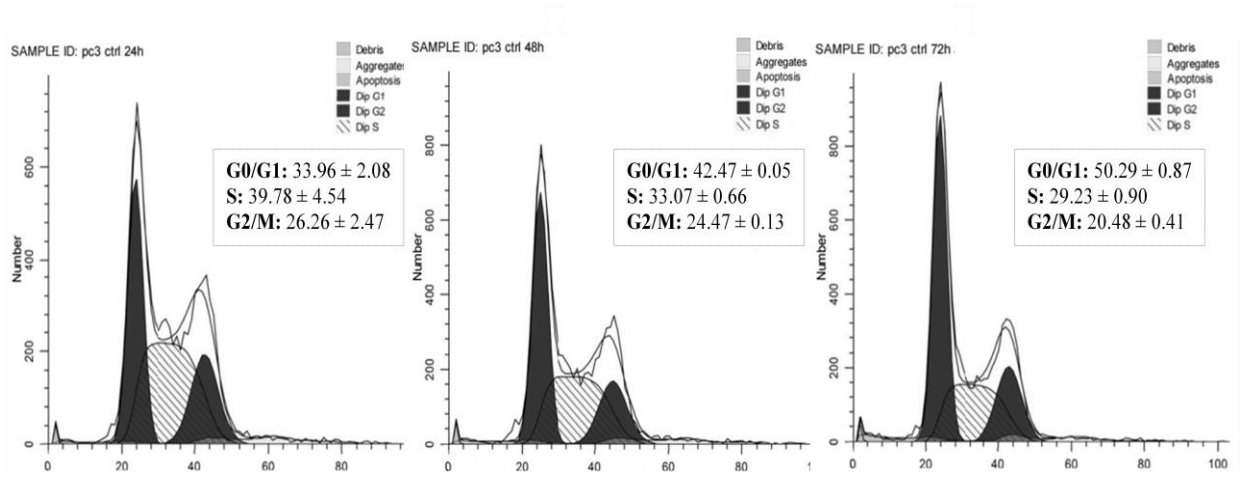
ΚΕΦΆΛΑΙΟ VI : ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Συστατικό	Κατηγορία	Συντακτικός τύπος
βανιλίνη	φαινόλη	
κινναμωμικό οξυ	φαινόλη	
τυροσόλη	φαινόλη	
υδροξυ- τυροσόλη	φαινόλη	
p-υδροξυ- βενζοϊκό οξυ	φαινόλη	
p- υδροξυ- φαινυλοξικό οξυ	φαινόλη	
φλωρετικό οξύ	φαινόλη	
βανιλικό οξύ	φαινόλη	
ομοβανιλική αλκοόλη	φαινόλη	
πρωτοκατεχικό οξυ	φαινόλη	
3-4 διυδροξυφαινυλοξικό οξύ	φαινόλη	
συριγγικό οξυ	φαινόλη	

Συστατικό	Κατηγορία	Συντακτικός τύπος
o-κουμαρικό οξυ	φαινόλη	
p- κουμαρικό οξυ	φαινόλη	
γαλλικό οξύ	φαινόλη	
φερουλικό οξύ	φαινόλη	
καφεϊκό οξύ	φαινόλη	
σιναπικό οξύ	φαινόλη	
χρυσίνη	φαινόλη	
επικατεχίνη	φαινόλη	
ναριγκενίνη	φαινόλη	
κατεχίνη	φαινόλη	
γενιστεϊνη	φαινόλη	

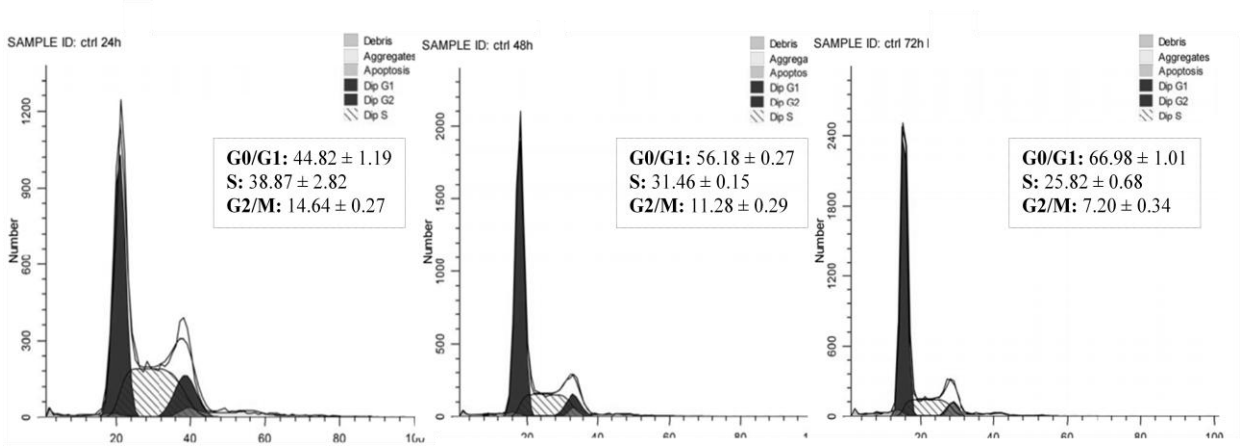
Συστατικό	Κατηγορία	Συντακτικός τύπος
καμπφερόλη	φαινόλη	
χλωρογενικό οξυ	φαινόλη	
ροσμαρινικό οξύ	φαινόλη	
κερκετίνη	φαινόλη	
θυμόλη	τερπενοειδής φαινόλη	
καρβακρόλη	τερπενοειδής φαινόλη	
ολεανολικό οξύ	τερπενικό οξύ	
ουρσολικό οξύ	τερπενικό οξύ	

Στην Εικόνα 1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον έλεγχο της κατανομής των καρκινικών κυττάρων του προστάτη (PC3) στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου απουσία παράγοντα, στο σύνολο των πειραμάτων που διεξήχθησαν. Η καλλιέργεια των κυττάρων αναλύθηκε έπειτα από 24, 48 και 72 h συνεχούς ανάπτυξης.



Εικόνα 1 Κατανομή των καρκινικών κυττάρων του προστάτη στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου (αρνητικός μάρτυρας) έπειτα από 24, 48 και 72 h επώασης. Οι τιμές είναι μ. όροι ± sd έξι προσδιορισμών

Στην παρακάτω Εικόνα (Εικόνα 2) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον έλεγχο της κατανομής των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (HT29) στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου απουσία παράγοντα, στο σύνολο των πειραμάτων που διεξήχθησαν. Η καλλιέργεια των κυττάρων αναλύθηκε έπειτα από 24, 48 και 72 h συνεχούς ανάπτυξης.



Εικόνα 2 Κατανομή των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου (αρνητικός μάρτυρας) έπειτα από 24, 48 και 72 h επώασης. Οι τιμές είναι μ. όροι ± sd έξι προσδιορισμών

Αντιδραστήριο/Διαλύτης	Εταιρία
3-(4-Υδρόξυ-Φαινυλ)-1-Προπανόλη	Aldrich, Germany
BSTFA	Supelco
DCFH-DA	Sigma, Germany
DPPH$^{\bullet}$	Aldrich, Germany
Folin-Ciocalteu	Aldrich, Germany
TPTZ	Alfa Aesar, US
Trolox	Sigma, Germany
Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό Οξύ (EDTA)	Merck, Germany
Αλβουμίνη Ορού Μόσχου (BSA)	Sigma, Germany
Αναστολέας Πρωτεασών (PMSF)	Sigma, Germany
Αντιδραστήριο Bradford	Sigma, Germany
Απόλυτη Αιθανόλη (EtOH)	Fluka, Germany
Ασκορβικό Οξύ (AA)	Merck, Germany
Διαιθυλαιθέρας	Fluka, Germany
Διάλυμα Ficoll	GE Healthcare Life Sciences,UK
Διάλυμα Θρυψίνης-EDTA	Sigma, Germany
Διάλυμα Κυτταρομετρητή	BD Biosciences, US
Διάλυμα Λύσης Κυττάρων	Cell Signaling Technology, US
Διάλυμα Πυροσταφυλικού Νατρίου	Gibco, UK
Διάλυμα Υπεροξειδίου του Υδρογόνου	Sigma, Germany
Διάλυμα Φορμαλδεΰδης	Sigma, Germany
Διάλυμα Χρωστικής Giemsa	Sigma, Germany
Διάλυμα Χρωστικής Κυανούν του Τρυπανίου	Gibco, UK
Διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO)	Alfa Aesar, US
Εμβρυϊκός Βόειος Ορός (FBS)	Gibco, UK
Ένυδρος Θειικός Χαλκός ($CuSo_4 \times 5H_2O$)	Merck, Germany
Ένυδρος Χλωριούχος Σίδηρος ($FeCl_2 \times 4H_2O$)	Merck, Germany
Duoset ELISA Kit για τη μέτρηση της IL-6	RnD Systems, UK
Duoset ELISA Kit για τη μέτρηση της MCP-1	RnD Systems, UK
Duoset ELISA Kit για τη μέτρηση του TNF-α	RnD Systems, UK
ELISA Kit για τη μέτρηση της GSH	Oxis International Inc
ELISA Kit για τη μέτρηση της IL-8	RnD Systems, UK
ELISA Kit για τη μέτρηση του NF-κB p65	Cell Signaling Technology, US
Ισοπροπυλική Αλκοόλη	Fluka, Germany
Ιωδιούχο Προπίδιο	Sigma, Germany
Καλλιεργητικό Υλικό DMEM	Gibco, UK
Καλλιεργητικό Υλικό RPMI-1640	Gibco, UK
Κρυσταλλικό Ιώδες	Fisher Scientific, US
Λιποπολυσακχαρίδιο (LPS)	Sigma, Germany
Μεθανόλη (MeOH)	Fluka, Germany
Μεταφωσφορικό Οξύ	Merck, Germany
MTT	Sigma, Germany
Οξικό Οξύ (AcOH)	Merck, Germany
Πενικιλλίνη- Στρεπτομυκίνη (100 Units/mL-100 μg/mL)	Gibco, UK

Αντιδραστήριο/Διαλύτης	Εταιρία
Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών (PBS)	Fisher Scientific, US
Τριχλωριούχος Σίδηρος ($FeCl_3$)	Merck, Germany
Υδροχλώρικό Οξύ (HCl, 12 N)	Merck, Germany
Φεροζίνη	Aldrich, Germany
Χλωριούχο Νάτριο (NaCl)	Merck, Germany