



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΠΜΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ**

Εργαστήριο Χημείας-Βιοχημείας-Φυτικοχημείας Τροφίμων

Δήμητρα Κογιάννου

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**«Φυσικά αντιοξειδωτικά, αντιοξειδωτική δράση και *in vitro* βιολογική δράση
αφεψημάτων από Ελληνικά βότανα»**



Τριμελής Επίτροπή

Νικόλαος Καλογερόπουλος
Επίκουρος Καθηγητής Χ.Π.
(Επιβλέπων)

Ανδριάννα Καλιώρα
Λέκτορας Χ.Π.

Αντωνία Χίου
Επίκουρη Καθηγήτρια Χ.Π.

Αθήνα, 2011



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΠΜΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ**

Εργαστήριο Χημείας-Βιοχημείας-Φυσικοχημείας Τροφίμων

Δήμητρα Κογιάννου

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**«Φυσικά αντιοξειδωτικά, αντιοξειδωτική δράση και *in vitro* βιολογική δράση
αφεψημάτων από Ελληνικά βότανα»**

Τριμελής Επίτροπή

Νικόλαος Καλογερόπουλος
Επίκουρος Καθηγητής Χ.Π.
(Επιβλέπων)

Ανδριάννα Καλιώρα
Λέκτορας Χ.Π.

Αντωνία Χίου
Επίκουρη Καθηγήτρια Χ.Π.

Αθήνα, 2011

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Χημείας-Βιοχημείας-Φυσικοχημείας Τροφίμων, του Τμήματος Διαιτολογία-Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών σπουδών Εφαρμοσμένη Διαιτολογία-Διατροφή, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2010-2011, υπό την επίβλεψη του κ. Νικόλαου Καλογερόπουλου.

Μετά το πέρας της διατριβής, θα ήθελα, αρχικά, να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα, Επίκουρο Καθηγητή κ. Νικόλαο Καλογερόπουλο, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και πιστεύοντας στις δυνατότητές μου, μου έδωσε την ευκαιρία να διευρύνω τις γνώσεις στον τομέα των Τροφίμων και της Υγείας. Οι πολύτιμες γνώσεις του και η φιλική του στάση με βοήθησαν να ολοκληρώσω με επιτυχία την παρούσα διατριβή.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ αξίζει επίσης στη Λέκτορα κ. Ανδριάννα Καλιώρα, που με την πείρα, τις γνώσεις, την υπομονή και τη φιλική της στάση με βοήθησε να ολοκληρώσω ευχάριστα και με επιτυχία τη μεταπτυχιακή μου διατριβή.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Αντωνία Χίου, που με βοήθησε και μου συμπαραστάθηκε καθ' όλη την διάρκεια της προσπάθειάς μου, καθώς και όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, που ήταν πάντα στη διάθεσή μου όποτε τους χρειάστηκα.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω προσωπικά τη Διδάκτορα Αγγελική Κουντούρη και την Υποψήφια Διδάκτορα Αριστέα Γκιοζάρη για τις συμβουλές τους και την προθυμία τους να με βοηθήσουν όποτε τις χρειάστηκα, καθώς και τους συμφοιτητές μου, Μαρία Ζουρίδη και Παναγιώτη Κανέλλο, που ήταν πάντα δίπλα μου και με ενθάρρυναν όποτε συναντούσα δυσκολίες.

Ευχαριστώ επίσης τον κ. Δημήτριο Τσακαλάκη, για την ευγενικά προσφορά των βοτάνων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Τέλος, θα ήθελα να αφιερώσω την παρούσα διατριβή στους γονείς μου, Άννα και Αχιλλέα, καθώς και στην αδερφή μου, Πένυ, εκφράζοντας ταυτόχρονα την ευγνωμοσύνη και την αγάπη μου, που είναι δίπλα, στηρίζοντας τις επιλογές μου. Χωρίς αυτούς δεν θα τα είχα καταφέρει και για αυτό τους ευχαριστώ πολύ.

Περιεχόμενα:

Περίληψη.....	7
Summary	8
Συντμήσεις	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	10
1.1 Φαρμακευτικά Φυτά.....	11
1.1.1 Γενικά στοιχεία	11
1.1.2 Φαρμακευτικά φυτά – Βότανα	11
1.2 Φυτοχημικά	12
1.2.1 Ορισμός.....	12
1.2.2 Ταξινόμηση φυτοχημικών.....	12
1.2.3 Πολυφαινόλες.....	13
1.2.4 Καροτενοειδή	18
1.2.5 Τερπένια- Αλκαλοειδή	19
1.2.6 Βιταμίνες	20
1.2.7 Βιολογική δράση-Δράσεις στην υγεία	21
1.3 Καρκίνος	22
1.3.1 Γενικά στοιχεία	22
1.3.2 Καρκίνος του παχέος εντέρου	23
1.3.3 Καρκίνος του προστάτη	26
1.4 Μηχανισμοί δράσης φυτοχημικών στην εμφάνιση διαφόρων μορφών καρκίνου	28
1.4.1 Αντιοξειδωτική δράση	28
1.4.2 Αναστολή κυτταρικού πολλαπλασιασμού	34
1.4.3 Αντιφλεγμονώδης δράση	37
1.4.3.1 Γενικά στοιχεία	37
1.4.3.2 Αναστολή κυκλοξυγονασών (COX)	37
1.4.3.3 Αναστολή λιποξυγονασών (LOX)	38
1.4.3.4 Αναστολή της συνθετάσης του οξειδίου του αζώτου (NOS).....	39
1.4.3.5 Προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες.....	39
1.4.3.6 Πυρηνικός παράγοντας kappa B (NF-κB)	40
1.4.3.7 Ενεργοποιούσα πρωτεΐνη- 1(AP-1)	41
1.4.4 Μεταγωγείς σήματος και ενεργοποιητές μεταγραφής (STAT).....	41
1.4.5 Παράγοντες ανάπτυξης	42
1.5 Ελληνικά φαρμακευτικά φυτά	42

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	55
2.1 Φυτά	56
2.2 Διαδικασία παραλαβής αφυδατωμένου αφεψημάτος	56
2.3 Προσδιορισμός πολυφαινόλων	57
2.3.1 Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου με την μέθοδο Folin-Ciocalteu.....	57
2.3.2 Προσδιορισμός των ολικών φλαβονολών	59
2.4 Αντιοξειδωτικές δοκιμές	59
2.4.2. Προσδιορισμός αναγωγικής ικανότητας μέσω αναγωγής του Fe^{+3} σε Fe^{+2} (FRAP).....	60
2.5 Κυτταρικές σειρές	62
2.5.1 Κυτταρικές σειρές HT29 και PC3	62
2.5.2 Καλλιέργεια κυττάρων	62
2.6 Μέθοδοι εκτίμησης βιολογικής δράσης αφεψημάτων	65
2.6.1 Διαλυτοποίηση στερεού υπολείμματος αφεψημάτων	65
2.6.2 Έλεγχος του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη μέθοδο MTT	65
Επίδραση των κυττάρων με διαλύματα αφεψημάτων.....	65
2.6.3 Μέτρηση των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH)	67
Επίδραση των κυττάρων με διαλύματα αφεψημάτων.....	67
2.6.4 Μέτρηση των επιπέδων της ιντερλευκίνης 8 (IL-8)	69
Επίδραση των κυττάρων με διαλύματα αφεψημάτων.....	69
2.6.5 Μέτρηση του μεταγραφικού παράγοντα Πυρηνικού Παράγοντα-κΒ (NF-κΒ) p65	71
2.7 Στατιστική επεξεργασία	73
ΚΕΦΑΛΑΙΟ III ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	74
3.1 Παραλαβή αφυδατωμένου αφεψημάτος	75
3.2 Περιεχόμενο αφεψημάτος σε φυσικά αντιοξειδωτικά	76
3.2.1 Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο αφεψημάτων.....	76
3.2.2 Ολικές φλαβονόλες αφεψημάτων	78
3.3 Αντιοξειδωτική δράση	79
3.4 Μελέτη της επίδρασης των αφεψημάτων των βοτάνων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στις κυτταρικές σειρές HT29 και PC3	84
3.5 Μελέτη της επίδρασης των αφεψημάτων των βοτάνων στα επίπεδα της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης (GSH) στις κυτταρικές σειρές HT29 και PC3	93
3.6 Μελέτη της επίδρασης των αφεψημάτων των βοτάνων στα επίπεδα της ιντερλευκίνης-8 (IL-8) στις κυτταρικές σειρές HT29 και PC3	97

3.7 Μελέτη της επίδρασης των αφεψημάτων των βοτάνων στα επίπεδα του πυρηνικού παράγοντα-κΒ (NF-κΒ) p65 στις κυτταρικές σειρές HT29 και PC3	102
Επίλογος-Συμπεράσματα	108
Βιβλιογραφία.....	110

Περίληψη

Τα βότανα χρησιμοποιούνται από την αρχαιότητα για την παρασκευή ροφημάτων, την προσθήκη γεύσης στα φαγητά καθώς και για τη συντήρηση των τροφίμων, ενώ σήμερα αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της Μεσογειακής Διατροφής. Διαθέτουν ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία, οι οποίες αποδίδονται στα συστατικά που περιέχουν (πολυφαινόλες, καροτενοειδή, βιταμίνες κ.α.). Πολλές από τις δράσεις τους, κυρίως αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδης, αντιμικροβιακή, καρδιοπροστατευτική κ.α., καθώς και οι θεραπευτικές τους ιδιότητες έχουν αναλυθεί και αποδειχθεί από ποικίλες επιδημιολογικές μελέτες. Τα τελευταία χρόνια, εξαιτίας αυτών των ευεργετικών τους δράσεων, εξετάζεται η χρήση τους για την πρόληψη, αντιμετώπιση ή/και τη συμπληρωματική θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνου, ιδίως αυτών που σχετίζονται με τη διατροφή.

Δεδομένου ότι, τα στοιχεία που έχουν συλλεχθεί για τα Ελληνικά βότανα είναι περιορισμένα, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο προσδιορισμός των πολυφαινολικών συστατικών και η μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας, αφεψημάτων από βότανα της Ελληνικής χλωρίδας: *Origanum microphyllum*, *Origanum dictamnus*, *Origanum majorana*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Satureja thymbra*, *Thymus vulgaris*, *Sideritis syriaca*, *Salvia officinalis*, *Mentha pulegium*, *Hypericum perforatum* και *Marticaria chamomilla*. Εξετάζεται, επίσης, η ικανότητα τους να αναστέλλουν, *in vitro*, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, να επηρεάζουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων και τα επίπεδα της ιντερλευκίνης-8 καθώς και ο πιθανός μηχανισμός αντικαρκινικής δράσης, μέσω του NF-κΒ, σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου και του προστάτη.

Από την εξέταση των αποτελεσμάτων βρέθηκε ότι τα αφεψήματα των βοτάνων που μελετήθηκαν:

- ✓ Περιέχουν πολυφαινολικά συστατικά, μέρος των οποίων ανήκουν στα φλαβονοειδή
- ✓ Παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση, η οποία βρέθηκε σε άμεση συσχέτιση με το πολυφαινολικό τους περιεχόμενο
- ✓ Αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων με δοσο- και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο
- ✓ Μειώνουν τη συγκέντρωση της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης GSH
- ✓ Μειώνουν την έκκριση της IL-8
- ✓ Ρυθμίζουν την έκφραση του NF-κΒ

Τα αποτελέσματα, μετά από στατιστική επεξεργασία, βρέθηκαν ότι ήταν στατιστικά σημαντικά, με εξαίρεση τη μείωση στα επίπεδα της GSH.

Summary

Since antiquity, herbs have been used for preparing beverages, for adding flavor to food as well as for conserving it/food, while today they are an integral part of the Mediterranean Diet. The beneficial health properties are attributed to several compounds such as polyphenols, carotenoids, vitamins etc. Many of their activities especially the antioxidant, anti-inflammatory, anti-bacterial, cardioprotective etc, as well as their therapeutic properties have been established in a variety of epidemiological studies.

Given that data which have been collected about the Greek herbs is limited, the purpose of the present MSc Thesis is to study the antioxidant, anti-inflammatory and chemopreventive effect of herbal infusions of the Greek Flora: *Origanum microphyllum*, *Origanum dictamnus*, *Origanum majorana*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Satureja thymbra*, *Thymus vulgaris*, *Sideritis syriaca*, *Salvia officinalis*, *Mentha pulegium*, *Hypericum perforatum*, and *Marticaria chamomilla*. For this purpose, their potential to scavenge free radicals, inhibit cell proliferation, regulate redox status, interleukin-8 concentration and NF- κ B in colon cancer HT29 and prostate cancer PC3 cells were examined.

Interpretation of the results led to conclusions listed below:

Herb infusions studied

- ✓ contain polyphenolic compounds, part of which belong to flavonoids
- ✓ show antioxidant action, which was found in direct correlation with their polyphenolic content
- ✓ inhibit cancer cell proliferation of in a dose- and time- dependent manner
- ✓ reduce intracellular GSH concentration
- ✓ reduce IL-8 concentration
- ✓ regulate NF- κ B expression

Συντμήσεις

AP-1	Ενεργοποιούσα πρωτεΐνη-1
Cdk	Κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνες
COX	Κυκλοξυγονάσες
DPPH	1,1-διφαινυλο-2-πικρυλο-υδράζυλο
EGCG	Γαλλικός εστέρας της επιγαλλοκατεχίνης
EGF	Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
EGFR	Υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα
FGF	Αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών
GSH	Γλουταθειόνη
HETE	Υδροξυ-εικοσατετραενοϊκά οξέα
IGF	Ινσουλινοεξαρτώμενος αυξητικός παράγοντας
IκB	Αναστολέας ενεργοποίησης του NF-κB
IKK	Κινάση της IκB
IL-6,8,10,11	Ιντερλευκίνη-6, 8, 10, 11
LDL	Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
LOX	Λιποξυγονάση
LPS	Λιποσακχαρίδιο
NF-κB	Πυρηνικός παράγοντας-κappa B
NO	Μονοξείδιο του αζώτου
NOS	Συνθάση του οξειδίου του αζώτου
OH	Υδροξυλική ομάδα
PPAR	Υποδοχείς υπεροξεισωματίων ενεργοποιημένοι από «πολλαπλασιαστές»
pRb	Πρωτεΐνη ρετινοβλαστώματος
RNS	Δραστικές ενώσεις αζώτου
ROS	Δραστικές ενώσεις οξυγόνου
STAT	Μεταγωγείς σήματος και ενεργοποιητές μεταγραφής
TGF	Αυξητικός παράγοντας όγκων
TNF-α	Παράγοντας νέκρωσης όγκων-α
VEGF	Αυξητικοί παράγοντες του αγγειακού ενδοθηλίου
γ-GCL	γ-συνθετάση της γλουταμυλοκυστεΐνης
γ-INF	γ-ιντερφερόνη
ΙΦΝΕ	Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Νόσοι Εντέρου

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Φαρμακευτικά Φυτά

1.1.1 Γενικά στοιχεία

Ο συσχετισμός της διατροφής με την καλή υγεία και την ίαση δεν είναι κάτι καινούριο. Αυτή η σχέση είχε παρατηρηθεί ήδη από τη γέννηση της Ιατρικής. Το 400π.Χ ο Ιπποκράτης είχε τονίσει: “Η τροφή είναι το φάρμακό σου και το φάρμακό σου η τροφή σου”, ενώ η χρήση φαρμακευτικών φυτών ως παραδοσιακός τρόπος ίασης ποικίλων ασθενειών, φημολογείται από το 2800 π.Χ (Ritchie, 2007).

Επί χρόνια φυσικά προϊόντα, όπως τα βότανα και τα μπαχαρικά, χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση ποικίλων ασθενειών με εντυπωσιακά αποτελέσματα. Αν και αυτό έπαψε να ισχύει με την ανάπτυξη των συνθετικών φαρμάκων, ωστόσο πολλά είναι σήμερα τα φάρμακα στα οποία περιέχονται ως συστατικά φυτικές χημικές ενώσεις σε ποσοστό 40% (Zheng & Wang, 2001). Το ίδιο ισχύει για τα καλλυντικά και τα αρώματα (Mehta *et al.*, 2010).

1.1.2 Φαρμακευτικά φυτά – Βότανα

Ως φαρμακευτικά ορίζονται τα φυτά που παράγουν χημικές ενώσεις με θεραπευτική δράση για τον άνθρωπο. Ευρεία χρήση λόγω της θεραπευτικής τους δράσης έχουν τα βότανα. Για τους βοτανολόγους ο όρος «βότανα» αναφέρεται αυστηρά σε μικρά φυτά που παράγουν σπόρους, δεν διαθέτουν ξυλώδη κορμό και μαραίνονται με το τέλος της ευδόκιμης περιόδου. Για τους κλινικούς, ο όρος αναφέρεται όχι μόνο στα μικρά φυλλώδη φυτά, αλλά και σε φλοιούς, ρίζες, βολβούς, φύλλα, σπόρους, άνθη ή καρπούς δένδρων, θάμνων και εκχυλίσματά τους που αξιολογούνται για τις ιαματικές τους ιδιότητες, ενώ έχουν ιδιαίτερα οργανοληπτικά κι αρωματικά χαρακτηριστικά.

Πολλά είναι τα βότανα που χρησιμοποιούνται από την αρχαιότητα για τις θεραπευτικές τους ιδιότητες καθώς και για την ικανότητά τους να προσδίδουν ιδιαίτερη γεύση και άρωμα στα φαγητά. Επιπλέον, τα βότανα χρησιμεύουν στη συντήρηση και αποθήκευση διαφόρων τροφίμων καθώς βοηθούν στη διατήρηση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων τους. Ενδεικτικά αναφέρονται ορισμένα παραδείγματα βοτάνων καθώς και κάποιες από τις θεραπευτικές ιδιότητες που τους αποδίδονται.

- Βασιλικός: αντισπασμωδικό, διουρητικό, κατά της δυσκοιλιότητας, βοηθητικό της μνήμης
- Δάφνη: τονωτικό, ορεκτικό, κατά των αλάτων

- 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

Στο παρελθόν δεν ήταν γνωστός ο ακριβής τρόπος δράσης των βοτάνων και οι θεραπευτικές ιδιότητες τους καταγράφηκαν εμπειρικά. Αυτή η θεραπευτική συμπεριφορά των βοτάνων προκάλεσε το ενδιαφέρον πλήθους ερευνητών που πραγματοποίησαν μελέτες στην προσπάθεια τους να επαληθεύσουν αυτές τις παρατηρήσεις και να εξακριβώσουν πού οφείλονται οι ιδιότητες αυτές. Σήμερα είναι γνωστό ότι οι ιδιότητες των φαρμακευτικών φυτών στην αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών και στη συντήρηση τροφίμων οφείλονται σε χημικές ενώσεις που περιέχουν, γνωστές με τον όρο φυτοχημικά.

Σήμερα μεγάλο μέρος της επιστημονικής έρευνας έχει στραφεί στη διερεύνηση πιθανής χρήσης των φαρμακευτικών φυτών για την πρόληψη, την ίαση ή/και τη συμπληρωματική θεραπεία χρόνιων ασθενειών όπως ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα κ.α.. Τα αποτελέσματα σε πολλές των περιπτώσεων είναι ενθαρρυντικά.

1.2 Φυτοχημικά

1.2.1 Ορισμός

Τα ευεργετικά αποτελέσματα από την κατανάλωση φαρμακευτικών φυτών αποδίδονται σε ένα πλήθος βιοδραστικών, μη θρεπτικών, χημικών ενώσεων που περιέχουν, γνωστά ως φυτοχημικά και τα οποία έχει βρεθεί ότι συνδέονται με μείωση του κινδύνου πολλών χρόνιων ασθενειών (Rafter, 2002, Liu, 2004).

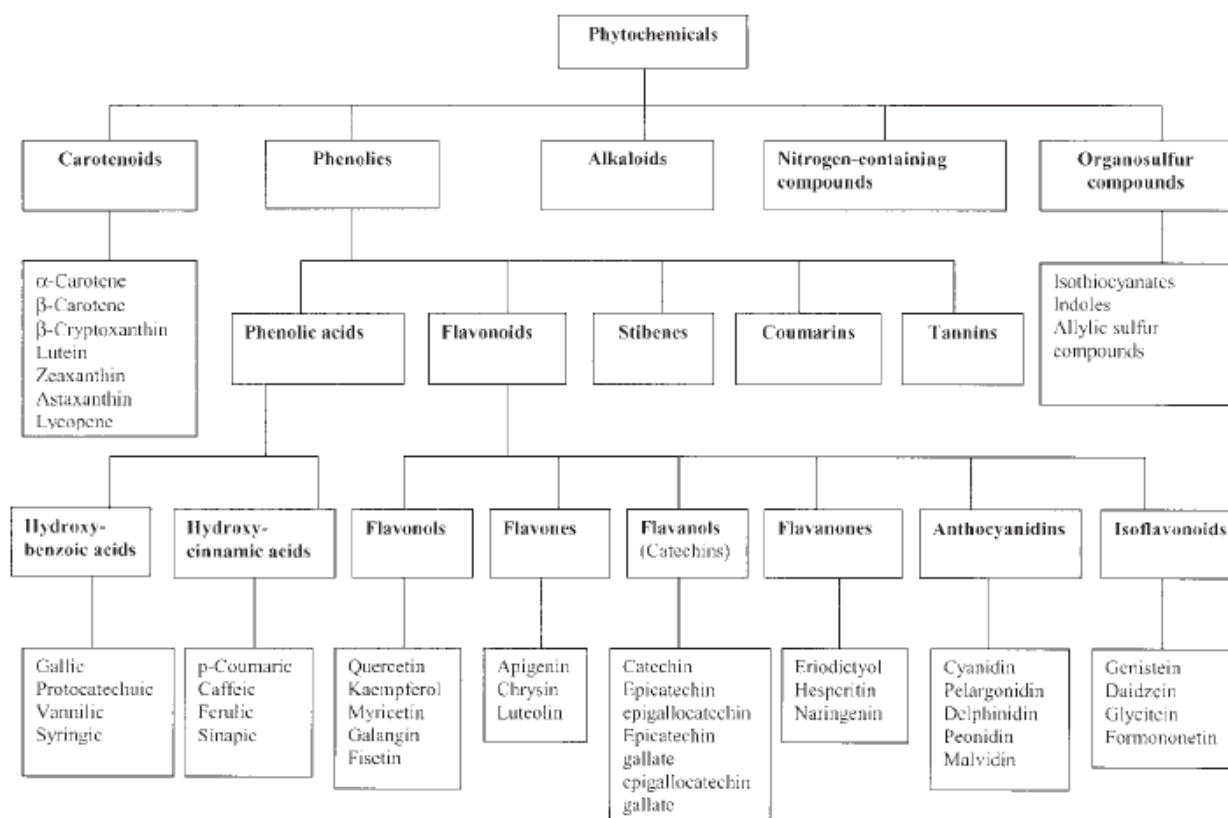
1.2.2 Ταξινόμηση φυτοχημικών

Τα φυτοχημικά μπορούν να ταξινομηθούν με βάση δομικές και λειτουργικές ομοιότητες (Εικόνα 1.1), σε πέντε βασικές κατηγορίες:

- ✓ Πολυφαινόλες
- ✓ Καροτενοειδή
- ✓ Αζωτούχες ενώσεις
- ✓ Αλκαλοειδή

✓ Θειούχες οργανικές ενώσεις

Από αυτές, οι πολυφαινόλες και τα καροτενοειδή έχουν μελετηθεί περισσότερο (Liu, 2004).



Εικόνα 1.1 Ταξινόμηση φυτοχημικών

1.2.3 Πολυφαινόλες

Οι διαιτητικές φαινόλες ή πολυφαινόλες αποτελούν μια κατηγορία φυσικών προϊόντων, που απαρτίζονται από πολλές διαφορετικές χημικές ενώσεις. Τα φυτά αποτελούν άριστη πηγή φαινολικών συστατικών και μάλιστα σε αρκετά μεγάλες συγκεντρώσεις. Σήμερα περισσότερες από 8000 φαινολικές και πολυφαινολικές δομές έχει εξακριβωθεί ότι αποτελούν συστατικά των φυτικών οργανισμών (Tamara *et al.*, 2004, Cheynier, 2005).

Οι πολυφαινόλες απαντώνται στους φυτικούς οργανισμούς ως δευτερογενείς μεταβολίτες και διακρίνονται ανάλογα με την προέλευση τους, τη βιολογική τους δράση και τη δομή τους, κυρίως βάσει του αριθμού των φαινολικών τους δακτυλίων και των δομικών ομάδων που είναι συνδεδεμένες σε αυτούς σε (Butterfield *et al.*, 2002, Tsao, 2010):

A. φαινολικά οξέα

B. φλαβονοειδή (φλαβόνες, φλαβανόνες, φλαβονόλες, ισοφλαβονοειδή, κατεχίνες, χαλκόνες, ανθοκυανίνες)

Γ. στυλβένια

Δ. κουμαρίνες

Η βιοσύνθεσή τους διαφέρει μεταξύ των φυτικών οργανισμών και εξαρτάται από την ηλικία του φυτού και από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως το νερό, τα θρεπτικά συστατικά και η ένταση της ηλιακής ακτινοβολίας (D' Archivio *et al.*, 2007).

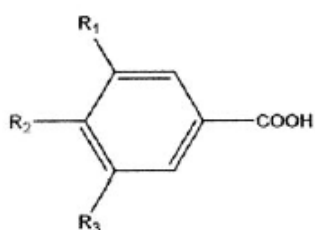
Α. Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα αποτελούν την πιο απλή, συγκριτικά, κατηγορία και συνιστούν το 1/3 των φαινολικών συστατικών που προσλαμβάνει ο άνθρωπος μέσω της διατροφής. Παράγονται από εξειδικευμένα κύτταρα, ενώ οι πρόδρομες ενώσεις για τη βιοσύνθεσή τους είναι η φαινυλαλανίνη και το σικιμικό οξύ από τα οποία και σχηματίζονται μέσω των ομώνυμων βιοσυνθετικών οδών.

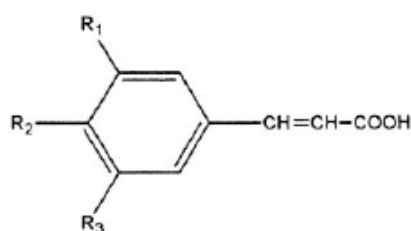
Τα φαινολικά οξέα μπορούν περαιτέρω να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με τη δομή τους σε παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (C6-C1) και του κινναμωμικού οξέος (C6-C3). Και οι δύο αυτές κατηγορίες έχουν ως βασικό σκελετό έναν αρωματικό δακτύλιο υποκατεστημένο με μια καρβοξυλική ομάδα (βενζοϊκά οξέα) ή με ένα προπenoϊκό οξύ (κινναμωμικά οξέα) (Bravo, 1998, Liu, 2004). Επίσης και οι δύο δομές μπορούν να βρεθούν με διαφορετικό βαθμό υδροξυλίωσης ή/και μεθυλίωσης (Barberan & Clifford, 2000).

Τα φαινολικά οξέα μπορεί να βρίσκονται είτε σε ελεύθερη μορφή μέσα στα κύτταρα είτε να σχηματίζουν ενώσεις με άλλα μόρια. Συνήθως σχηματίζουν εστέρες με κινικό οξύ, τρυγικό οξύ ή παράγωγα σακχάρων και καλούνται χλωρογενικά οξέα (Liu, 2004, Cheynier, 2005). Τέλος, η χαρακτηριστική χημική δομή των φαινολικών οξέων τους επιτρέπει να συνδέονται με εστερικούς ή αιθερικούς δεσμούς και να σχηματίζουν διμερείς δομές. Για παράδειγμα η λιγνίνη σχηματίζεται από την ένωση δυο καταλοίπων κινναμωμικού οξέος (Tamara *et al.*, 2004). Δομές μερικών φαινολικών οξέων παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.2.

(a) Benzoic acid



(b) Cinnamic acid



Benzoic acid Derivatives	Substitutions		
	R ₁	R ₂	R ₃
p-Hydroxybenzoic	H	OH	H
Protocatechuic	H	OH	OH
Vannilic	CH ₃ O	OH	H
Syringic	CH ₃ O	OH	CH ₃ O
Gallic	OH	OH	OH

Cinnamic acid Derivatives	Substitutions		
	R ₁	R ₂	R ₃
p-Coumaric	H	OH	H
Caffeic	OH	OH	H
Ferulic	CH ₃ O	OH	H
Sinapic	CH ₃ O	OH	CH ₃ O

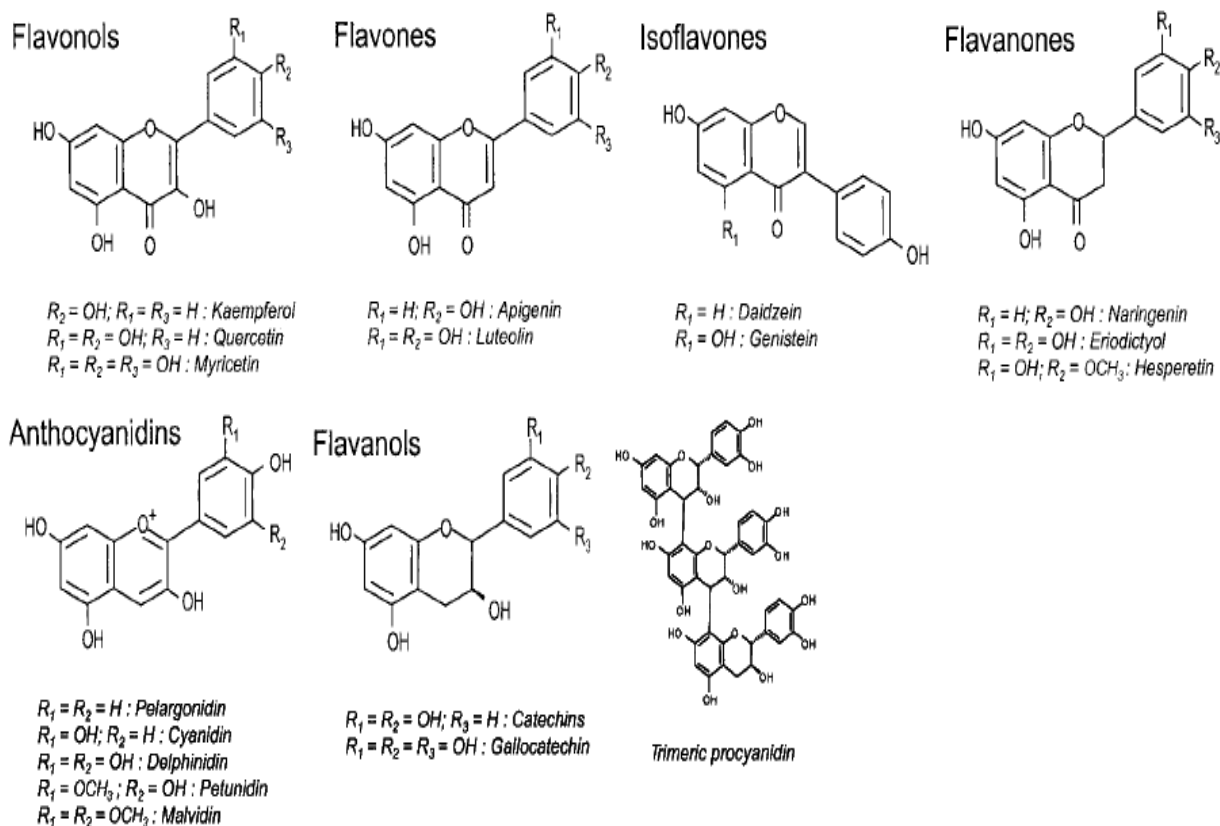
Εικόνα 1.2 Δομές φαινολικών οξέων α) βενζοϊκό οξύ και παράγωγά του, β) κινναμωμικό οξύ και παράγωγά του

B. Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι μια μεγάλη κατηγορία πολυφαινολικών ενώσεων που παράγονται από πολλούς φυτικούς οργανισμούς. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 4000 τέτοιες ενώσεις. Αρχικά τα φλαβονοειδή είχαν κατατάχθει στις βιταμίνες με την ονομασία βιταμίνη P ή βιταμίνη C2 καθώς παρατηρήθηκε ότι προστατεύουν την βιταμίνη C από την οξείδωση. Ωστόσο, βλέποντας ότι δεν έχουν τις ιδιότητες των βιταμινών, καθώς η ανεπάρκεια αυτών δεν οδηγούσε σε συμπτώματα παρόμοια με αυτά της ανεπάρκειας βιταμινών, τα κατέταξαν στην κατηγορία των πολυφαινολών (Hollman, 1997).

Οι ενώσεις αυτές έχουν παρόμοιο βασικό δομικό σκελετό. Συγκεκριμένα, αποτελούνται από δυο αρωματικούς δακτυλίους (A και B), οι οποίοι ενώνονται μεταξύ τους με τρία άτομα άνθρακα προς ένα οξυγονωμένο ετερόκυκλο δακτύλιο (C) (Ross *et al.*, 2002, Liu, 2004). Ανάλογα με τη χημική τους δομή τα φλαβονοειδή διακρίνονται σε φλαβονόλες, φλαβόνες, φλαβονόνες, ισοφλαβονοειδή, φλαβανόλες -που περιλαμβάνουν τις κατεχίνες και τις προανθοκυανιδίνες- και ανθοκυανίνες (Hollman, 1997, Manach *et al.*, 2004). Τα ισοφλαβονοειδή, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα φλαβονοειδή τα οποία έχουν τον B φαινολικό δακτύλιο στη θέση 2 του ετεροκυκλικού δακτυλίου, έχουν το B φαινολικό δακτύλιο στη θέση 3 (Hollman, 1997). Τα πολυμερή παράγωγα ονομάζονται ταννίνες και χωρίζονται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με τη δομή τους, τις συμπυκνωμένες και τις υδρολυμένες ταννίνες. Οι

συμπυκνωμένες ταννίνες είναι πολυμερή των φλαβονοειδών και οι υδρολυμένες περιλαμβάνουν το γαλλικό οξύ (Vinson, 1998). Στην Εικόνα 1.3 παρουσιάζονται οι βασικές δομές των φλαβονοειδών και οι υποκατηγορίες τους.



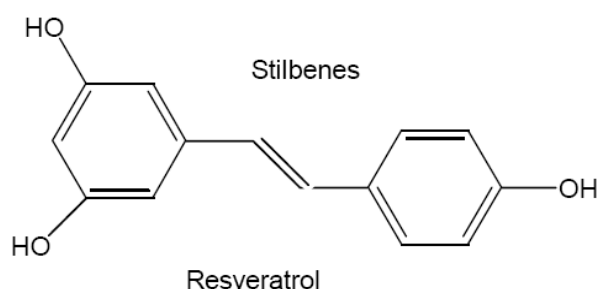
Εικόνα 1.3 Δομές και υποκατηγορίες φλαβονοειδών

Τα φλαβονοειδή, όπως και τα φαινολικά οξέα, απαντούν σε ελεύθερη μορφή αλλά μπορούν να σχηματίζουν ενώσεις και με άλλες ουσίες. Αποτέλεσμα αυτού είναι να βρίσκονται είτε ως γλυκοζυλιωμένα παράγωγα με απλούς υδατάνθρακες, όπως γλυκόζη, ραμνόζη ή/και γαλακτόζη, αραβινόζη, ξυλόζη (φλαβονόλες), αλλά και με δισακχαρίτες (φλαβανόνες, ισοφλαβόνες). Τέλος, οι φλαβόνες συνήθως απαντούν ως εστέρες με μόρια λουτεολίνης ή απιγενίνης (Manach *et al*, 2004).

Επιπλέον, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι, οι ισοφλαβόνες, αν και δεν είναι στεροειδή, έχουν παρόμοια δομή με τα οιστρογόνα. Συγκεκριμένα, στις θέσεις 4 και 7 έχουν ως υποκαταστάτη το OH, όπως και το μόριο της οιστραδιόλης. Το γεγονός αυτό τους προσδίδει ψευδοορμονικές ιδιότητες (Cassidy *et al.*, 2000). Γι' αυτό το λόγο χαρακτηρίζονται ως διφαινολικά οιστρογόνα (Zheng *et al.*, 2003).

Γ. Στιλβένια

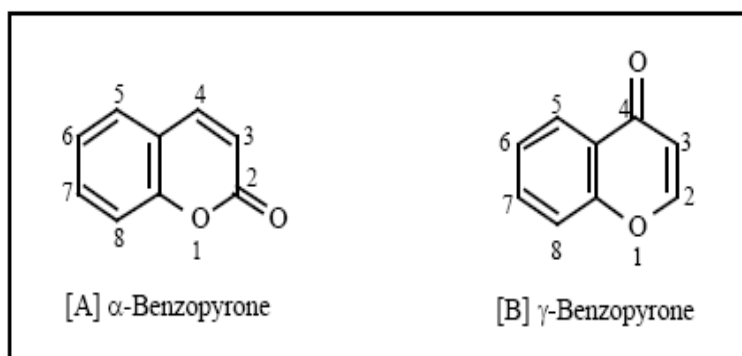
Τα σιλβένια συντίθενται από παράγωγα του κινναμωμικού οξέος. Στον Α δακτύλιο τους φέρουν δύο OH στη μέτα- θέση, ενώ στο δακτύλιο Β οι υδροξυλομάδες ή οι μεθοξυ ομάδες βρίσκονται σε όρθο-, μέτα- ή/και πάρα- θέση. Ανάλογα με το παράγωγο του κινναμωμικού οξέος από το οποίο και συντίθενται, τα στιλβένια φέρουν στο δακτύλιο Β τους αντίστοιχους υποκαταστάτες. Στα φυτά και στα τρόφιμα βρίσκονται σε μικρές ποσότητες ως μονομερή στιλβένια, είτε ως διμερή, τριμερή ή πολυμερή, οι λεγόμενες βινιφερίνες (Cassidy *et al.*, 2000). Κύριος εκπρόσωπος της κατηγορίας αυτής είναι η ρεσβερατρόλη (Εικόνα 1.4) η οποία έχει μελετηθεί περισσότερο.



Εικόνα 1.4 Δομή ρεσβερατρόλης.

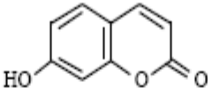
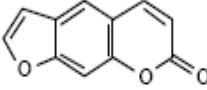
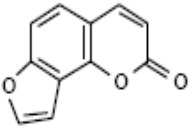
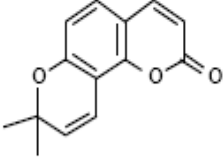
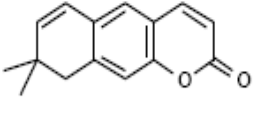
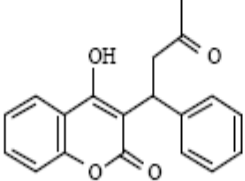
Δ. Κουμαρίνες

Οι κουμαρίνες ανήκουν στις διαιτητικές φαινόλες και χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός βενζοϊκού δακτυλίου συνδεδεμένο με έναν πυρονικό (pyrone) δακτύλιο. Οι βενζοπυρόνες μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κατηγορίες: τις βενζο-α-πυρόνες, στις οποίες ανήκουν οι κουμαρίνες και τις βενζο-γ-πυρόνες που ανήκουν τα φλαβονοειδή (Εικόνα 1.5). Στον πίνακα 1.1 παρουσιάζονται οι βασικές υποκατηγορίες κουμαρινών, τα δομικά χαρακτηριστικά που τις διακρίνουν και παραδείγματα για κάθε μια από αυτές (Lacy & O’Kennedy, 2004).



Εικόνα 1.5 Χημική δομή βενζοπυρονικών υποομάδων: α) κουμαρίνες, β) φλαβονοειδή

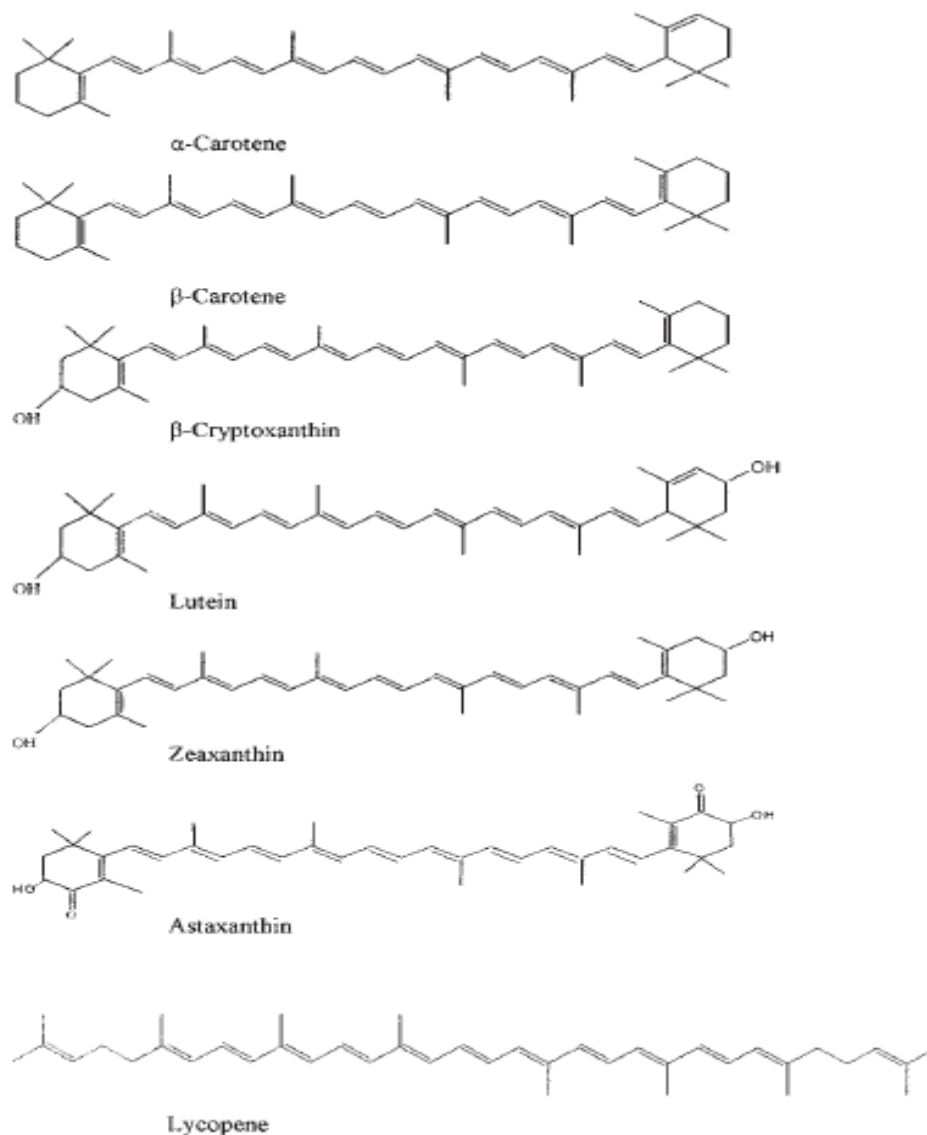
Πίνακας 1.1 Υποκατηγορίες κουμαρινών, δομικά χαρακτηριστικά τους και παραδείγματα.

Classification	Features	Examples
SIMPLE COUMARINS	Hydroxylated, alkoxyated or alkylated on benzene ring	 7-hydroxycoumarin
FURANOCOUMARINS	5-membered furan ring attached to benzene ring. Linear or Angular	 Psoralen  Angelicin
PYRANOCOUMARINS	6-membered pyran ring attached to benzene ring. Linear or Angular	 Seselin  Xanthyletin
PYRONE-SUBSTITUTED COUMARINS	Substitution on pyrone ring, often at 3-C or 4-C positions	 Warfarin

1.2.4 Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή είναι μια μεγάλη κατηγορία φυσικών χρωστικών συστατικών τα οποία, όπως και οι πολυφαινόλες, έχουν μελετηθεί αρκετά. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί περισσότερα από 600 διαφορετικά καροτενοειδή. Αποτελούν συστατικά όχι μόνο των φυτικών οργανισμών, αλλά και των μικροοργανισμών. Τα καροτενοειδή έχουν στο σκελετό τους 40 άνθρακες που προέρχονται από ισοπρενικές μονάδες. Τα άκρα τους μπορεί να είναι κυκλοποιημένα (β-καροτένιο) ή όχι (λυκοπένιο) ή και τα δύο. Μπορούν να βρεθούν σε διαφορετικά επίπεδα υδρογόνωσης ή να διαθέτουν λειτουργικές ομάδες οι οποίες περιέχουν οξυγόνο. Το κεντρικό τμήμα των ενώσεων αυτών σχηματίζεται από μια μακριά ανθρακική αλυσίδα με συζυγιακούς διπλούς δεσμούς. Αποτέλεσμα αυτών είναι να έχουν χαρακτηριστικό σχήμα, χημική δραστηριότητα και ικανότητα απορρόφησης του φωτός. Πρέπει να αναφερθεί ότι ορισμένα καροτενοειδή παρουσιάζουν προ-βιταμινική δράση. Συγκεκριμένα, το β-καροτένιο, το α-καροτένιο και η β-κρυπτοξανθίνη εμφανίζουν παρόμοια λειτουργία με την προ-βιταμίνη Α

(Liu, 2004, Rao & Rao, 2007). Στην Εικόνα 1.6 παρουσιάζονται χημικές δομές μερικών καροτενοειδών.

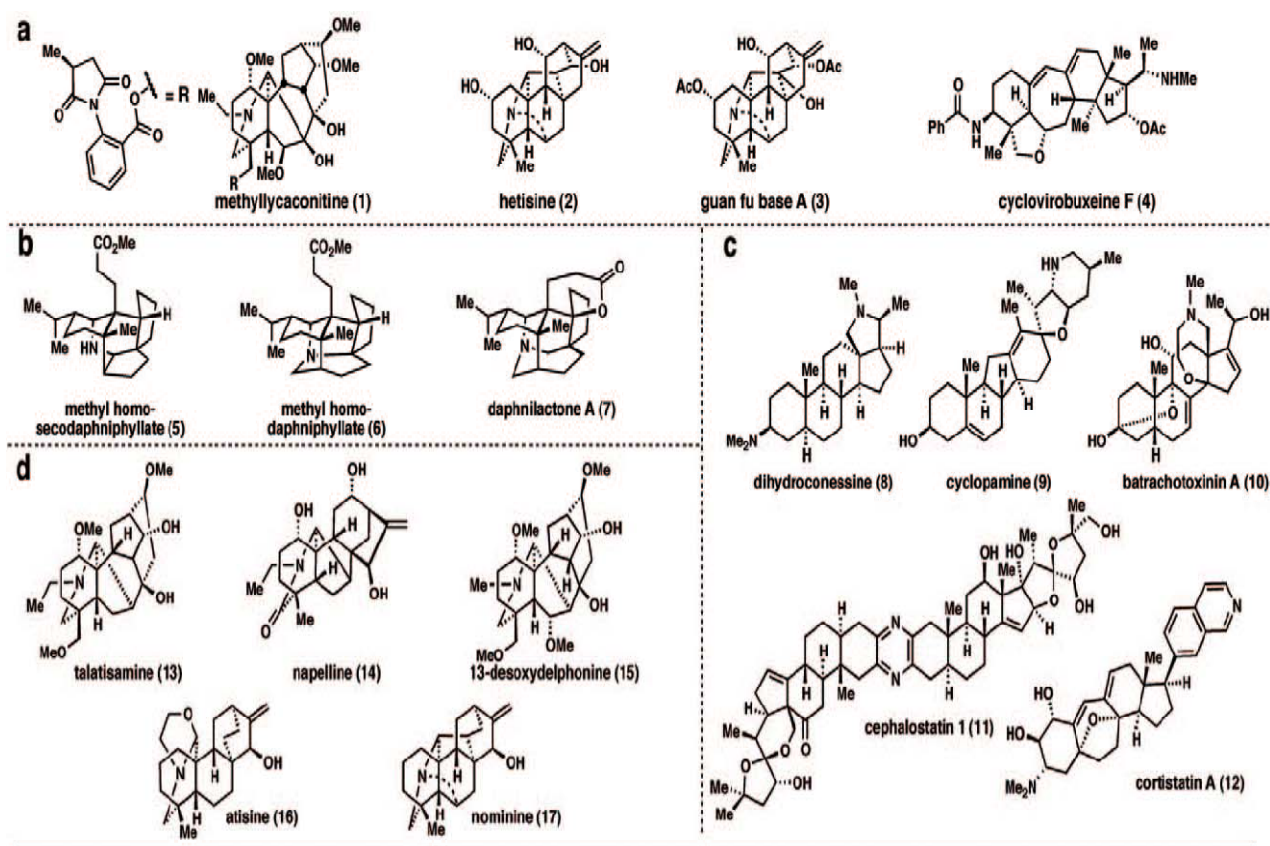


Εικόνα 1.6 Χημικές δομές κοινών διαιτητικών καροτενοειδών.

1.2.5 Τερπένια- Αλκαλοειδή

Μεγάλη ποικιλία τερπενίων περιέχονται στα αιθέρια έλαια και στις ρητίνες. Τα αιθέρια έλαια αποτελούνται από πτητικά, χαμηλού μοριακού βάρους τερπένια, ενώ οι ρητίνες είναι μίγμα πτητικών και μη πτητικών τερπενίων (Σαββίδης, 2000). Τα τερπένια είναι υδρογονάνθρακες φυτικής προέλευσης με ανθρακικό σκελετό ισοπρενίου $\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$ (2-μεθυλοβουταδιένιο1,3) ανοικτής αλύσου ή κυκλικό (μόνο- ή δικυκλικό). Σύμφωνα με τον αριθμό ισοπρενικών ομάδων στο μόριό τους ταξινομούνται σε (Conolly & Hill, 2007): ημιτερπένια (1 ισοπρενική ομάδα), μονοτερπένια (2 ισοπρενικές ομάδες), σесκιτερπένια (3

ισοπρενικές ομάδες), διτερπένια (4 ισοπρενικές ομάδες), σεσκιτερπένια (5 ισοπρενικές ομάδες), τριτερπένια (6 ισοπρενικές ομάδες), τετρατερπένια (8 ισοπρενικές ομάδες), πολυτερπένια (>8 ισοπρενικές ομάδες). Με πολυμερισμό του ισοπρενίου σε κατάλληλες συνθήκες μπορεί να πραγματοποιηθεί χημική σύνθεση των τερπενίων. Για το λόγο αυτό τα τερπένια ονομάζονται και ισοπρενοειδή. Η βιοσύνθεσή τους απαιτεί τη μεταβολική οδό του μεβαλονικού οξέος ή εναλλακτικά, την οδό φωσφογλυκεριναλδεϋδης/πυροσταφυλικού οξέος. Το πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP) και το πυροφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο (DMAPP), προϊόντα της βιοσυνθετικής οδού του μεβαλονικού, αποτελούν τις πρόδρομες ενώσεις σύνθεσης όλων των τερπενίων (Taiz & Zeiger, 2006). Στην Εικόνα 1.7 παρουσιάζονται οι βασικές δομές των τερπενίων.

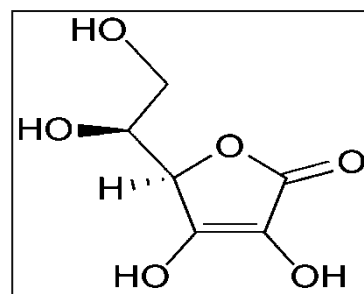


Εικόνα 1.7 Βασικές χημικές δομές των τερπενίων.

1.2.6 Βιταμίνες

Οι βιταμίνες είναι τάξη οργανικών χημικών ενώσεων, οι οποίες είναι απαραίτητες για την ομαλή αύξηση και διατήρηση ενός ζωντανού οργανισμού, ο οποίος δεν είναι σε θέση να τις συνθέσει, ενώ δεν έχουν θερμιδική αξία. Ο Φούνκ ήταν ο πρώτος που πρότεινε το 1912 τον όρο βιταμίνη, ο οποίος υιοθετήθηκε, αλλά αποδείχθηκε ατυχής, καθώς πολλές ενώσεις της τάξης των βιταμινών δεν περιέχουν άζωτο. Οι βιταμίνες συμβολίστηκαν με γράμματα σύμφωνα με τη λειτουργία της κάθε μίας από αυτές. Στη πορεία του χρόνου τους δόθηκαν κατάλληλες

ονομασίες που σχετίζονται με τη χημική τους δομή. Σήμερα είναι γνωστές με ένα γράμμα του λατινικού αλφαβήτου ή με την εμπειρική τους ονομασία. Οι βιταμίνες έχουν διαφορές μεταξύ τους ως προς τη δομή και τη λειτουργία (Εικόνα 1.8). Διακρίνονται σε δύο βασικές κατηγορίες, στις υδατοδιαλυτές (βιταμίνη C και η ομάδα βιταμινών B) και στις λιποδιαλυτές (βιταμίνες A, D, E και K).



Εικόνα 1.8 Δομή ασκορβικού οξέος.

1.2.7 Βιολογική δράση-Δράσεις στην υγεία

Όπως προαναφέρθηκε, το ενδιαφέρον των επιστημόνων έχει στραφεί στην έρευνα των ευεργετικών δράσεων των φυτοχημικών στην υγεία. Από επιδημιολογικές μελέτες έχει βρεθεί ότι η κατανάλωση τροφίμων πλούσιων σε φυτοχημικά, βοηθά στη διατήρηση της καλής υγείας αλλά και στην πρόληψη διαφόρων ασθενειών. Στα τρόφιμα αυτά περιλαμβάνονται φρούτα, λαχανικά, προϊόντα ολικής άλεσης, βότανα καθώς και ροφήματα όπως καφές, σοκολάτα, κρασί, μπύρα κ.α..

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει αρκετές έρευνες για την κατανόηση της προστατευτικής δράσης των φυτοχημικών, κυρίως των πολυφαινόλων, αλλά και των υπολοίπων φυτοχημικών, έναντι χρόνιων ασθενειών όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ο καρκίνος, τα νευροεκφυλιστικά νοσήματα, ο διαβήτης, η οστεοπόρωση και άλλες ασθένειες που συνδέονται με το οξειδωτικό στρες (Manach *et al.*, 2004, Scalbert *et al.*, 2005, Rao & Rao, 2007). Η ικανότητά τους να προστατεύουν έναντι ασθενειών οφείλεται σε ένα πλήθος δράσεων, οι οποίες αποδίδονται στη χημική δομή τους, (Han *et al.*, 2007) και είναι:

- ✓ αντιοξειδωτική
- ✓ αντιμικροβιακή
- ✓ αντιαλλεργική
- ✓ αντιφλεγμονώδης
- ✓ αντισηπτική
- ✓ αντικαρκινική
- ✓ αναστολή της αγγειογένεσης
- ✓ αντιγηραντική
- ✓ αντιαποπρωτική
- ✓ αντιαθηρογόνος

- ✓ αγγειοδιασταλτική, μέσω της παραγωγής ενδοκυτταρικού NO
- ✓ καρδιοπροστατευτική
- ✓ βελτίωση της λειτουργίας του ενδοθηλίου

Οι διαιτητικές πολυφαινόλες, συγκεκριμένα, εμφανίζουν αυτές τις δράσεις λόγω της ικανότητάς τους να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες, να αναστέλλουν οξειδωτικά ένζυμα, να διεγείρουν ενδογενή αντιοξειδωτικά ένζυμα, να επηρεάζουν τον κυτταρικό κύκλο και τέλος να ρυθμίζουν τη μεταβίβαση σήματος (Han *et al.*, 2007).

Στη συνέχεια της παρούσας διπλωματικής διατριβής θα παρουσιαστούν με λεπτομέρεια μόνο οι βιολογικές δράσεις που έχουν σχέση με την πρόληψη και τη θεραπεία του καρκίνου.

1.3 Καρκίνος

1.3.1 Γενικά στοιχεία

Ο καρκίνος είναι ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας που παρατηρούνται σήμερα στις αναπτυγμένες χώρες. Οι στατιστικές δείχνουν ότι αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου μετά τα καρδιαγγειακά νοσήματα (Jemal *et al.*, 2008, Khuhaprema & Srivatanakul, 2008). Συγκεκριμένα, κάθε χρόνο περίπου δέκα εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως διαγιγνώσκονται ότι πάσχουν από καρκίνο και περίπου 6.2 εκατομμύρια καταλήγουν από αυτή την ασθένεια (Das *et al.*, 2007, Jemal *et al.*, 2008). Συνήθως προσβάλλει ανθρώπους μεγάλης ηλικίας, υπάρχουν όμως και μορφές καρκίνου που εμφανίζονται σε άτομα νεαρής ηλικίας, ακόμη και σε παιδιά.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση καρκίνου μπορεί να είναι γενετικοί και περιβαλλοντικοί. Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός φυσιολογικών και βιοχημικών καρκινικών παραγόντων, όπως η υπεριώδης και ιονίζουσα ακτινοβολία, το κάπνισμα, ιοί, βακτήρια, παράσιτα, καθώς και τρόφιμα με μυκοτοξίνες. Κάποιοι τύποι καρκίνου μπορεί να οφείλονται στο οξειδωτικό στρες και στην ύπαρξη ελευθέρων ριζών που προκαλούν οξειδωτικές βλάβες σε βιομόρια (π.χ. DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια) (Huang *et al.*, 2010).

Ο όρος «καρκίνος» δεν αποδίδεται σε μία και μόνη ασθένεια, αλλά σε μια ομάδα ασθενειών που χαρακτηρίζονται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Τα κύτταρα στο σώμα μας αυξάνονται, διαιρούνται και πεθαίνουν με έναν αυστηρά ελεγχόμενο τρόπο. Στα πρώτα χρόνια της ζωής, και μέχρι την ενηλικίωση του ατόμου, ο ρυθμός διαίρεσης των

κυττάρων του ανθρώπινου οργανισμού είναι έντονος. Στη συνέχεια τα κύτταρα διαιρούνται μόνο για να αντικαταστήσουν άλλα που έχουν φθαρεί ή πεθάνει.

Τα καρκινικά κύτταρα διαφέρουν από τα φυσιολογικά κύτταρα, διότι συνεχίζουν να διαιρούνται ανεξέλεγκτα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη μιας μάζας κυττάρων, που ονομάζεται όγκος. Οι όγκοι είναι καλοήθεις ή κακοήθεις. Οι καλοήθεις όγκοι, των οποίων τα κύτταρα περιβάλλονται από συνδετικό ιστό, δεν είναι επεκτατικοί, δηλαδή δεν εισβάλλουν στους γύρω ιστούς και δεν εξαπλώνονται σε άλλα σημεία του σώματος. Γενικά, δεν προκαλούν σοβαρή βλάβη στο σώμα, εκτός εάν λόγω του μεγέθους τους ασκούν πίεση σε ζωτικά όργανα.

Αντίθετα, στους κακοήθεις όγκους τα κύτταρα εμφανίζουν διαφορετική μορφολογία σε σχέση με τα φυσιολογικά, εισβάλλουν στους γειτονικούς ιστούς, ενώ μέσω της κυκλοφορίας του αίματος ή της λέμφου είναι δυνατόν να μεταφερθούν σε άλλα σημεία του σώματος και να σχηματίσουν δευτερογενείς όγκους, φαινόμενο που ονομάζεται μετάσταση. Οι καρκίνοι του αίματος ονομάζονται λευχαιμίες. Τα προβλήματα υγείας που προκαλούνται στο άτομο εξαρτώνται από το μέγεθος του όγκου, από τη θέση του στο σώμα, από το στάδιο ανάπτυξής του, από το αν έχει εισβάλει στους γειτονικούς ιστούς και σε ποια έκταση και από το αν έχει υπάρξει μετάσταση.

Κάθε καρκίνος (π.χ. καρκίνος του πνεύμονα, της μήτρας, του προστάτη κτλ) έχει διαφορετικά συμπτώματα, διαφορετική εξέλιξη και επομένως αποτελεί διαφορετική ασθένεια. Για λόγους οικονομίας θα αναλυθούν μόνο δύο τύποι καρκίνου, του παχέος εντέρου και του προστάτη, που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, δεδομένου ότι ανήκουν στους τύπους καρκίνου που επηρεάζονται από τη διατροφή.

1.3.2 Καρκίνος του παχέος εντέρου

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι ο δεύτερος τύπος καρκίνου με τη μεγαλύτερη θνησιμότητα (492.000 άνθρωποι/έτος) και ο τρίτος σε διάγνωση (945.000 άνθρωποι/έτος) στις ΗΠΑ στο σύνολο του πληθυσμού (Dihal *et al.*, 2006, Jemal *et al.*, 2008).

Αιτιολογικά, ο καρκίνος του παχέος μπορεί να είναι είτε κληρονομήσιμος, είτε επίκτητος, είτε να εμφανίζεται λόγω κάποιας χρόνιας φλεγμονής, όταν το άτομο πάσχει για παράδειγμα από κάποια Ιδιοπαθή Φλεγμονώδη Νόσο του Εντέρου (Young *et al.*, 2005). Στον κληρονομήσιμο καρκίνο του παχέος εντέρου η γενετική μετάλλαξη, η οποία μεταβιβάζεται στην επόμενη γενιά, συμβαίνει σε κρίσιμα γονίδια, όπως είναι τα ογκοκατασταλτικά (γονίδια υπεύθυνα για την καταστολή όγκων), γονίδια που σχετίζονται την επιδιόρθωση του DNA ή και σε άλλα γονίδια

(Young *et al.*, 2005). Στον επίκτητο καρκίνο του παχέος εντέρου, της περισσότερες φορές λαμβάνει χώρα κάποια γενετική μετάλλαξη σε σωματικό κύτταρο, στα ίδια συνήθως γονίδια με τον κληρονομήσιμο τύπο, είτε ως μέρος του φυσιολογικού κυτταρικού του κύκλου, είτε μετά από έκθεση σε κάποιο διαιτητικό καρκινικό παράγοντα (Young *et al.*, 2005). Οι διατροφικοί παράγοντες είναι υπεύθυνοι για το 70-90% καρκίνων τέτοιου τύπου και η βελτιστοποίηση της διαίτας μπορεί να εμποδίσει την εμφάνιση των περισσότερων των περιπτώσεων (Shannon *et al.*, 1996, Ahmed, 2004). Οι Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Νόσοι του Εντέρου (ΙΦΝΕ) είναι επίσης αιτιολογικός παράγοντας για την εμφάνιση καρκίνου του παχέος εντέρου εξαιτίας του αυξημένου οξειδωτικού στρες, που επηρεάζει σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες (Khuhaprema & Srivatanakul, 2008).

Ανεξάρτητα της πολυπαραγοντικής αιτιολογίας της νόσου, είναι γνωστό ότι δίαιτα πλούσια σε θερμίδες, λιπαρά (κυρίως ζωικής προέλευσης) (Hamer *et al.*, 2008), κόκκινο κρέας και αρωματικούς πολυκυκλικούς υδρογονάνθρακες (Cross & Sinha, 2004), επίσης αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ και συγκεκριμένες ασθένειες όπως ο διαβήτης (Payne, 1990, Khaw *et al.*, 2004) και η παχυσαρκία (Payne, 1990) αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου. Αντίθετα, μια δίαιτα πλούσια σε φρούτα και λαχανικά, κατά συνέπεια και σε πολυφαινόλες (Hamer *et al.* 2008), διαιτητικές ίνες (Mariadason *et al.*, 2001), λιπαρά οξέα μικρής αλύσου (Lambert *et al.* 2002), ροφήματα όπως το κόκκινο κρασί (Scalbert *et al.*, 2005) και το τσάι (Yang *et al.*, 2002, Scalbert *et al.*, 2005, Goncalves *et al.*, 2010) μικροθρεπτικά συστατικά όπως βιταμίνες A, C, E, D και ασβέστιο (Cosse *et al.*, 1989, Ahmed, 2004) μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Επιπρόσθετα, φάρμακα όπως τα μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη, οι αναστολείς κυκλοξυγονασών (Ahmed, 2004, Half & Arber, 2009) και του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) (Das *et al.*, 2007), οι ανταγωνιστές του PPAR (Pierzchalski *et al.*, 2008), καθώς και η μέτρια-έντονη σωματική άσκηση (Ahmed, 2004, Jemal *et al.*, 2008) μπορούν επίσης να μειώσουν τον κίνδυνο για καρκίνο του παχέος εντέρου.

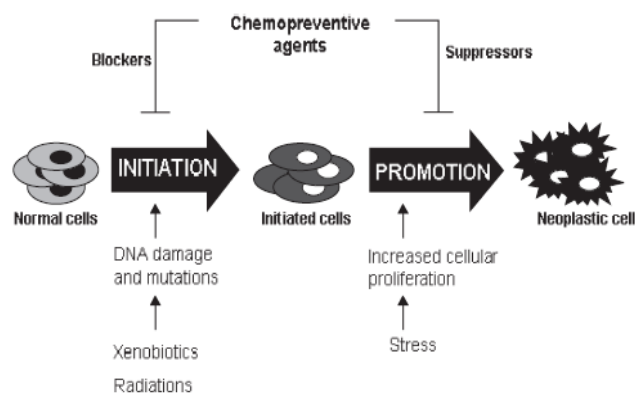
Το εντερικό επιθήλιο είναι ένα δυναμικός ιστός ο οποίος έχει την ικανότητα αναγέννησης. Στο κατώτερο τμήμα του λαμβάνει χώρα ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, ενώ στο ανώτερο, η κυτταρική διαφοροποίηση και η απόπτωση (Hague *et al.*, 1996, Dihal *et al.*, 2006). Η ισορροπία μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού, κυτταρικής διαφοροποίησης και απόπτωσης είναι απαραίτητη για την διατήρηση της ομοιόστασης του ιστού αυτού. Διαταραχές σε αυτές τις διαδικασίες είναι καθοριστικές για την ανάπτυξη καρκίνου του παχέος εντέρου (Konarikova *et al.*, 2000, Dihal *et al.*, 2006). Γενικά, η καρκινογένεση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία η οποία εξελίσσεται σε πολλές φάσεις στις οποίες μπορούν να συμβούν, γενετικής προέλευσης, μοριακές και κυτταρικές αλληλεπιδράσεις (Young *et al.*, 2005, Das *et al.*, 2007). Έχουν περιγραφθεί τρεις

φάσεις για την καρκινογένεση: α) η έναρξη: είναι ένα μη αντιστρεπτό στάδιο που περιλαμβάνει μια σειρά από γεγονότα. Αρχικά έκθεση στον καρκινογόνο παράγοντα ο οποίος μεταφέρεται σε όργανα και ιστούς, όπου στην συνέχεια είτε μεταβολίζεται είτε υφίσταται αποτοξικοποίηση. Οι δραστικοί μεταβολίτες του είναι ικανοί να προκαλέσουν κάποια γενετική βλάβη στο DNA (Surh, 2008). β) η προαγωγή, είναι η φάση που σε αντίθεση με την έναρξη είναι αντιστρέψιμη. Η προαγωγή διαρκεί περισσότερο από την αρχική φάση και



Εικόνα 1.9 Ενδοσκοπική εικόνα καρκίνου του παχέος εντέρου

χαρακτηρίζεται από την απορύθμιση των σηματοδοτικών μονοπατιών που φυσιολογικά ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση (Mehta *et al.*, 2010). Τα κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη, τα οποία ονομάζονται νεοπλασματικά κύτταρα, αντιγράφονται και τέλος γ) η εξέλιξη του όγκου, η οποία χαρακτηρίζεται από απορύθμιση των διαδικασιών του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης καθώς και μείωση της απόπτωσης στα κύτταρα με βλάβη (αύξηση κακοήθους όγκου) και αύξηση της μεταστατικής και αγγειογενετικής ικανότητας (Surh, 2003, Ramos, 2007, Johnson, 2007). Στον άνθρωπο, ο καρκίνος του εντέρου σχετίζεται με σταδιακή αναστολή της απόπτωσης (Watson, 2004). Συνέπεια αυτού είναι τα κύτταρα του εντέρου που έχουν υποστεί βλάβη να μην αποβάλλονται από τον οργανισμό με κάποιον από τους μηχανισμούς εκκαθάρισης και να αναπτύσσονται όγκοι (Εικόνα 1.9) (Kim *et al.*, 2005, Athar *et al.*, 2009).



Εικόνα 1.10 Στάδια δράσης χημειοπροστατευτικών παραγόντων

Τις τελευταίες τρεις δεκαετίες, η χημειοπροστασία αποτελεί ένα πεδίο έντονης έρευνας. Ο όρος αυτός αναφέρεται στη χρήση συνθετικών και φυσικών συστατικών, σε φαρμακευτικές δόσεις, για τη μείωση του κινδύνου ανάπτυξης ή επανεμφάνισης του καρκίνου (Das *et al.*, 2007). Η διαδικασία της καρκινογένεσης μπορεί να διακοπεί ή να καθυστερήσει και στις τρεις φάσεις, έτσι οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες μπορούν να δράσουν απευθείας πριν ή μετά την έναρξη της καρκινογένεσης ή ακόμα μπορούν να καταστείλουν την εξέλιξή της. Στην περίπτωση που δρουν στη φάση της έναρξης την καρκινογένεσης, ονομάζονται *παρεμποδιστές* (blocker agents), ενώ όταν επηρεάζουν τη φάση της προαγωγής, *καταστολείς* (suppressor agents)

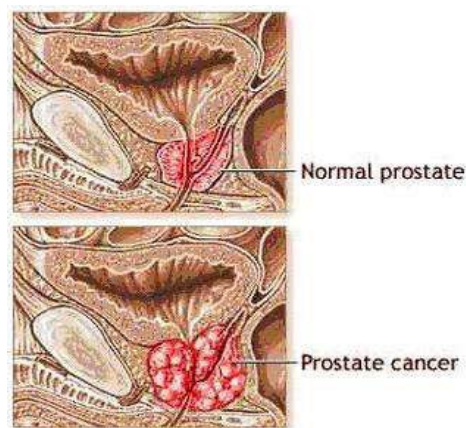
(Εικόνα 1.10) (Johnson, 2007). Οι πολυφαινόλες και άλλα φυτοχημικά μπορούν να προστατεύσουν έναντι αυτού του τύπου καρκίνου και με τους δυο προαναφερθέντες τρόπους (de Kok *et al.*, 2008). Αυτός είναι και ο κύριος λόγος που όλο και περισσότερα άτομα στρέφονται στην πρόληψη του καρκίνου μέσω της διατροφής, ενώ πολλοί έχουν αντικαταστήσει τις κλασσικές μεθόδους καταπολέμησης του καρκίνου και έχουν καταφύγει στα φαρμακευτικά φυτά με την ελπίδα ενός θεραπευτικού αποτελέσματος, το οποίο μπορεί να βελτιώσει τη ζωή τους (Chen *et al.*, 2008). Συγκεκριμένα, τα βότανα θεωρούνται ασφαλή, έχουν λιγότερες παρενέργειες και είναι οικονομικά, σε σχέση με τα φάρμακα, ενώ είναι λιγότερο πιθανό να προκαλέσουν εξάρτηση (Lynch & Berry, 2007). Η λεπτομερής παρουσίαση των μηχανισμών δράσης αυτών των συστατικών γίνεται στην υποενότητα 1.4.

1.3.3 Καρκίνος του προστάτη

Ο καρκίνος του προστάτη, τα τελευταία χρόνια, είναι ο τρίτος σε κατάταξη τύπους καρκίνου που προσβάλλει τους άντρες και ο έκτος σε διάγνωση αναφορικά με όλους τους τύπους (Ma & Chapman, 2009). Σύμφωνα με την Αμερικανική Εταιρία για τον Καρκίνο (American Cancer Society) το 2007 ο καρκίνος του προστάτη ήταν υπεύθυνος για τους περισσότερους θανάτους σε άντρες ηλικίας 85 χρονών, ξεπερνώντας ακόμα και αυτούς που προκαλούνται και τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Την ίδια χρονιά, ο αριθμός των περιστατικών μόνο για τις ΗΠΑ ήταν 218.890, ενώ οι θάνατοι από την ασθένεια ήταν περίπου 27.000 (Syed *et al.*, 2007).

Αιτιολογικά, ο καρκίνος του προστάτη είναι κυρίως επίκτητο νόσημα με λιγότερο από 10% να αποδίδεται σε κληρονομικούς παράγοντες. Συνεπώς, οι παράγοντες που επηρεάζουν την εξέλιξη της νόσου είναι είτε γενετικοί είτε περιβαλλοντικοί. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι έχουν παρατηρηθεί φυλετικές διαφορές στις περιπτώσεις εμφάνισης καρκίνου του προστάτη, με τους Αφρικανοαμερικανούς άντρες να βρίσκονται σε μεγαλύτερο κίνδυνο διάγνωσης για αυτή τη νόσο. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι υπάρχουν γεωγραφικές διαφορές στην ανάπτυξη του καρκίνου αυτού. Μεγαλύτερα ποσοστά εμφάνισης του καρκίνου παρατηρούνται στη νότια Αμερική και στη νότια Ευρώπη, ακολουθούν περιοχές της Μεσογείου και τέλος η Ασία. Επιδημιολογικές μελέτες σχετίζουν αυτές τις παρατηρήσεις με την διαίτα Δυτικού τύπου (Moyad & Carroll, 2004). Έχει βρεθεί ότι δίαιτες που χαρακτηρίζονται από υψηλή πρόσληψη λίπους και κυρίως κορεσμένου, σχετίζονται θετικά με την εμφάνιση καρκίνου του προστάτη (Astorg, 2004).

Η διαδικασία ανάπτυξης του καρκίνου του προστάτη είναι αποτέλεσμα γενετικών και επιγενετικών αλλαγών που οδηγούν σε μετατροπή των φυσιολογικών κυττάρων του αδενικού επιθηλίου του προστάτη σε προνεοπλασματικά και τέλος σε καρκινικά. Ο υπέρμετρος πολλαπλασιασμός των κυττάρων αυτών οδηγεί σε δυσπλασία και στην ανάπτυξη του καρκίνου (Εικόνα 1.11). Τα επιγενετικά φαινόμενα συμβαίνουν πολύ νωρίτερα από την ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη. Όσον αφορά τις γενετικές αλλοιώσεις, σε πολλές των περιπτώσεων



Εικόνα 1.11 Καρκίνος του προστάτη.

έχουν παρατηρηθεί απώλειες χρωμοσωμικών τμημάτων DNA. Αποτέλεσμα αυτού είναι να μην εκφράζονται ογκοκατασταλτικά γονίδια, γεγονός που οδηγεί στην ανάπτυξη όγκων (Konishi *et al.*, 2005).

Ο καρκίνος του προστάτη είναι ιδανική νόσος για χημειοπροστασία καθώς αναπτύσσεται και διαγιγνώσκεται σε άντρες άνω των 50 ετών. Η αναστολή της εξέλιξης της νόσου λοιπόν είναι σημαντική καθώς μπορεί να βελτιώσει την ποιότητα ζωής των ασθενών. Για το λόγο αυτό το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας έχει συγκεντρωθεί σε διατροφικά συμπληρώματα. Η χημειοπροστασία στον καρκίνο του προστάτη χαρακτηρίζεται από τη χρήση παραγόντων που μπορούν να αναστείλουν ή να καθυστερήσουν τη διαδικασία της καρκινογένεσης σε κάποια από τις φάσεις ανάπτυξής της. Η βασική διαφορά μεταξύ της χημειοπροστασίας και των κλασσικών μεθόδων θεραπείας του καρκίνου έγκειται στο γεγονός ότι, η πρώτη προσέγγιση έχει ως στόχο τη μείωση των περιστατικών της νόσου καταστέλλοντας τη διαδικασία ανάπτυξής της. Από επιδημιολογικές μελέτες και κλινικές δοκιμές έχει βρεθεί ότι πλήθος φυτοχημικών συστατικών, όπως κάποια καροτενοειδή, ορισμένες βιταμίνες κ.α., μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη σε όλες τις φάσεις ανάπτυξής του (Syed *et al.*, 2007). Η λεπτομερής παρουσίαση των μηχανισμών δράσης αυτών των συστατικών γίνεται, επίσης, στην υποενότητα 1.4.

1.4 Μηχανισμοί δράσης φυτοχημικών στην εμφάνιση διαφόρων μορφών καρκίνου

1.4.1 Αντιοξειδωτική δράση

Ως οξειδωτικό στρες χαρακτηρίζεται η ανισορροπία μεταξύ παραγωγής ελευθέρων ριζών και δραστικών μεταβολιτών -που ονομάζονται οξειδωτικοί παράγοντες ή δραστικές ενώσεις οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS)- και της αδρανοποίησης/απομάκρυνσής τους από προστατευτικούς μηχανισμούς- που ονομάζονται αντιοξειδωτικοί. Η ανισορροπία αυτή οδηγεί στην καταστροφή σημαντικών βιομορίων και κυττάρων μεταβάλλοντας έτσι την ομοιόσταση του οργανισμού με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ασθενειών (Durackova, 2010). Οι ROS παράγονται κατά τον φυσικό κυτταρικό μεταβολισμό και διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στην διέγερση σηματοδοτικών μονοπατιών σε φυτικά και ζωικά κύτταρα, ως απάντηση σε αλλαγές στις ενδο- και εξω- κυτταρικές συνθήκες (Jabs, 1999).

Οι περισσότερες από τις ROS παράγονται στα κύτταρα μέσω της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας, όπου τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στον τελικό τους αποδέκτη, το μοριακό οξυγόνο, μέσω αναπνευστικών συγκροτημάτων που βρίσκονται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (Poyton *et al.*, 2009). Κατά τη διάρκεια ενδογενών μεταβολικών αντιδράσεων, τα αερόβια κύτταρα παράγουν ROS (O_2^- , H_2O_2 , $OH^\bullet$) ως φυσιολογικά προϊόντα της βιολογικής αναγωγής του μοριακού οξυγόνου (Goossens *et al.*, 1999), σε ποσοστό 1-5% του ολικού οξυγόνου (Karihtala & Soini, 2007). Σε συνθήκες υποξίας από τη μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα μπορούν επίσης να παραχθούν οξειδία του αζώτου (NO), τα οποία προκαλούν την παραγωγή δραστικών ενώσεων αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS) (Poyton *et al.*, 2009).

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι ελεύθερες ρίζες, οι ROS, και οι RNS προκαλούν οξείδωση, δηλαδή αύξηση του θετικού φορτίου ενός στοιχείου ως αποτέλεσμα αποβολής ηλεκτρονίων σε μόρια γειτονικών κυττάρων, με αποτέλεσμα να προκαλούνται σοβαρές βλάβες ή ακόμα και θάνατος αυτών των κυττάρων. Με άλλα λόγια το οξειδωτικό στρες προκαλεί οξειδωτικές αλλαγές στα βιολογικά μακρομόρια -υδατάνθρακες, λιπίδια, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα (DNA/RNA)- και διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη γήρανση και στις εκφυλιστικές ασθένειες (Becker, 2004). Με σκοπό να αντιμετωπίσει την περίσσεια των ελευθέρων ριζών, που παράγονται λόγω του οξειδωτικού στρες, το ανθρώπινο σώμα έχει δημιουργήσει ένα εξειδικευμένο μηχανισμό για την διατήρηση της οξειδοαναγωγικής του ομοιόστασης. Αυτός ο ενδογενής μηχανισμός περιλαμβάνει δέσμευση ή σταθεροποίηση των

ROS, παρεμπόδιση του σχηματισμού τους, δημιουργία χηλικών συμπλόκων καθώς και ενζυμική και μη ενζυμική αντιοξειδωτική άμυνα μέσω συστατικών που παράγονται στο σώμα (υπεροξειδική δισμουτάση, καταλάση, ουρικό οξύ, πρωτεΐνες του πλάσματος) (Masella *et al.*, 2005).

Πηγή προέλευσης των τοξικών και δραστικών ελευθέρων ριζών στον οργανισμό δεν αποτελεί μόνο το μιτοχονδριακό σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων του αερόβιου μεταβολισμού, αλλά και ένα σύνολο άλλων ενδογενών και εξωγενών παραγόντων. Η ενζυμική δράση οξειδασών, οι φλεγμονές, ο μεταβολισμός του κυτοχρώματος P450, τα υπεροξειδισώματα, η αυτοοξείδωση ορισμένων υποστρωμάτων αποτελούν τους ενδογενείς παράγοντες, ενώ η υπεριώδης ακτινοβολία, οι ακτίνες X, οι ακτίνες γ, η υψηλή θερμιδική διαίτα, η μόλυνση της ατμόσφαιρας και το κάπνισμα τους εξωγενείς (Halliwell & Cross, 1994, Inoue *et al.*, 2003).

Η αντιοξειδωτική δράση που επιδεικνύουν τα φυτοχημικά αλλά και άλλες ιδιότητες τους, με τις οποίες ρυθμίζουν την κυτταρική λειτουργία, είναι και ο λόγος που ένα σημαντικό μέρος της επιστημονικής κοινότητας πραγματοποιεί πληθώρα μελετών, με σκοπό την ακριβή κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους αυτές οι ουσίες δρουν (Hartman, *et al.*, 2006).

Όσον αφορά τις πολυφαινόλες, η αντιοξειδωτική τους δράση οφείλεται στην ικανότητα τους να:

- δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες,
- είναι δότες ατόμων υδρογόνου ή
- δότες ηλεκτρονίων,
- δημιουργούν χηλικά σύμπλοκα με μεταλλικά κατιόντα (Afanasev *et al.*, 1989, Amarowicz *et al.*, 2004),
- αναστέλλουν τη δράση οξειδωτικών ενζύμων (οξειδάση της ξανθίνης, πρωτεϊνική κινάση C, κυκλοοξυγονάση, λιποοξυγονάση, NADH οξειδάση) (Park & Pezzuto, 2002)
- επάγουν τη δράση ενδογενών αντιοξειδωτικών ενζύμων. Συγκεκριμένα, ορισμένες πολυφαινόλες επάγουν ένζυμα της φάσης II του μεταβολισμού, όπως την τρανσφεράση της γλουταθειόνης, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η απέκκριση οξειδωτικών παραγόντων από τον οργανισμό, ή άλλα αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως η μεταλλοθειονίνη ή το κυτόχρωμα P450 (Xiuzhen *et al.*, 2007)
- προστατεύουν εξωγενή αντιοξειδωτικά, όπως τις βιταμίνες E και C, το β-καροτένιο, το λυκοπένιο κ.α..

Οι περισσότερες από τις πολυφαινόλες με αντιοξειδωτική δράση λειτουργούν ως τερματιστές της αλυσιδωτής αντίδρασης των ελευθέρων ριζών χάρη στην ικανότητά τους να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες. Ο μηχανισμός δέσμευσης των ελευθέρων ριζών από τις πολυφαινόλες πραγματοποιείται με δύο τρόπους, πιο συγκεκριμένα μέσω μιας άμεσης διαδικασίας μεταφοράς υδρογόνου και μέσω μιας συζευγμένης μεταφοράς πρωτονίου και ηλεκτρονίου.

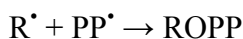
1. $R^{\bullet} + PPH \rightarrow RH + PP^{\bullet}$
2. $R^{\bullet} + PPH \rightarrow R^{-} + PPH^{\bullet} \rightarrow RH + PP^{\bullet}$

Όπου, PPH = πολυφαινόλες

$R^{\bullet}$ = δραστική ελεύθερη ρίζα [υπεροξειδικό ανιόν ($O_2^{\bullet-}$), υδροξυλική ρίζα ($HO^{\bullet}$)] (Robards *et al.*, 1999)

$PP^{\bullet}$ = φαινοξυ-ρίζα, ελεύθερη ρίζα πολυφαινόλης

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ο ενδιάμεσος μεταβολίτης, η φαινοξυ-ρίζα $PP^{\bullet}$, είναι σχετικά σταθερό μόριο και δύσκολα επιτρέπει μια νέα αλυσιδωτή αντίδραση μετά από προσβολή O_2 . Η ρίζα αυτή σταθεροποιείται με απεντοπισμό των μη συζευγμένων ηλεκτρονίων στον φαινολικό δακτύλιο μέσω του συντονισμού (Shahidi & Wanasundara, 1992). Ένας επιπλέον τρόπος που οι $PP^{\bullet}$ μπορούν να δράσουν ως τερματιστές της αλυσιδωτής αντίδρασης των ριζών είναι η ικανότητά τους να αντιδρούν με άλλες ρίζες όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση



Αυτή η ιδιότητα τους, να παραμένουν «αδρανή» ακόμα και μετά τη μετατροπή τους σε ρίζες, σε συνδυασμό με το ότι η παρουσία τους σε μικρές συγκεντρώσεις, σε σχέση με το προς οξείδωση υπόστρωμα, εμποδίζει ή καθυστερεί σημαντικά την οξείδωση του υποστρώματος παρουσία ελευθέρων ριζών, αποτελούν βασικές προϋποθέσεις που πρέπει να ικανοποιούν οι ουσίες για να θεωρείται ότι διαθέτουν αντιοξειδωτική δράση.

Σύμφωνα με μελέτες, η ικανότητα των πολυφαινολών να δρουν ως αντιοξειδωτικά είναι συνυφασμένη με τη δομή τους. Για τα φαινολικά οξέα συγκεκριμένα, η αντιοξειδωτική τους ικανότητα εξαρτάται από τον αριθμό και τη θέση των υδροξυλικών ομάδων σε σχέση με την δραστική καρβοξυλική ομάδα (Rice-Evans *et al.*, 1996, Robards *et al.*, 1999). Μονο-υδροξυ υποκαταστημένα βενζοϊκά οξέα με την υδροξυλική ομάδα (-OH) σε όρθο- ή πάρα- θέση σε σχέση με την καρβοξυλική ομάδα (-COOH) δεν παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δραστηριότητα κάτι που δεν συμβαίνει όταν ο υποκαταστάτης είναι σε μέτα- θέση (Rice-Evans *et al.*, 1996). Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών οξέων αυξάνεται καθώς αυξάνεται ο βαθμός υδροξυλίωσης (γαλλικό οξύ, 3-OH), αντίθετα όταν οι υδροξυλικές ομάδες στην 3- και 5- θέση

αντικατασταθούν με μεθοξυλικές ομάδες η ικανότητα τους αυτή μειώνεται (συριγλικό οξύ) (Rice-Evans *et al.*, 1996). Τα υδροξυκινναμωμικά οξέα παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα συγκριτικά με τα υδροξυβενζοϊκά οξέα (Andreasen *et al.*, 2001). Η υψηλότερη δραστηριότητα των υδροξυκινναμωμικών οξέων μπορεί να οφείλεται στην προπENOϊκή αλυσίδα ($\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$) η οποία παρουσιάζει μεγαλύτερη ικανότητα ως δότης υδρογόνου και καλύτερη σταθερότητα στο συντονισμό συγκριτικά με την καρβοξυλική ομάδα ($-\text{COOH}$) των υδροξυβενζοϊκών οξέων (Rice-Evans *et al.*, 1996). Γενικά ισχύει ότι η θέση των υποκαταστατών σε σχέση με την καρβοξυλική ομάδα ($-\text{COOH}$) και η απόσταση της από τον αρωματικό δακτύλιο είναι μια παράμετρος που επηρεάζει σημαντικά την αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών οξέων.

Γενικά, η θέση και ο βαθμός υδροξυλίωσης είναι σημαντικά για την αντιοξειδωτική δράση και των υπόλοιπων ενώσεων που ανήκουν στις πολυφαινόλες. Η πιο μελετημένη χημική ένωση που ανήκει στην ομάδα των φλαβονοειδών είναι η κερκετίνη. Η κερκετίνη εμφανίζει έντονη αντιοξειδωτική ικανότητα, γεγονός που οφείλεται: α) στην ακορεστότητα του ετεροκυκλικού δακτυλίου, η οποία είναι υπεύθυνη για τον απεντοπισμό των ηλεκτρονίων στον Β δακτύλιο, β) στην παρουσία του ο- διφαινολικού τμήματος στον Β δακτύλιο, ικανό να λειτουργήσει ως δότης Η για να σταθεροποιηθούν οι ελεύθερες ρίζες και γ) στις ομάδες ΟΗ στις θέσεις 3 και 5, που αυξάνουν την ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών. Η υδροξυτυροσόλη, η κατεχίνη, η κυανιδίνη, η μυρισετίνη, ο EGCG είναι ενώσεις που έχουν κάποια, ακόμα και όλα τα χαρακτηριστικά της κερκετίνης και μπορούν να δράσουν ως αντιοξειδωτικά επίσης, ωστόσο λόγω της δομής τους η ικανότητα τους μπορεί να είναι μειωμένη σε σχέση με της κερκετίνης (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Η ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών από τις πολυφαινόλες επηρεάζεται από την παρουσία σακχάρου στο μόριο τους και συγκεκριμένα μειώνεται παρουσία σακχάρων. Οι γλυκοζίτες συνήθως δεν είναι αντιοξειδωτικές ουσίες, αν και τα αντίστοιχα ελεύθερα μόρια τους μπορούν να δρουν ως αντιοξειδωτικά. Ωστόσο, και οι συζευγμένες πολυφαινόλες έχουν την ικανότητα να συμμετέχουν σε αντιοξειδωτικές αντιδράσεις και να δεσμεύουν ενεργά μόρια οξυγόνου ή αζώτου, η ικανότητα τους αυτή είναι όμως κατά πολύ μικρότερη σε σύγκριση με τις αντίστοιχες ελεύθερες μορφές τους (Williams *et al.*, 2004). Τέλος, η θέση στην οποία είναι δεσμευμένο το σάκχαρο είναι σημαντική για τη δράση του μορίου.

Μηχανισμούς αντιοξειδωτικής δράσης παρουσιάζουν επίσης και οι υπόλοιπες κατηγορίες πολυφαινολών, τα τερπένια, και ορισμένες βιταμίνες (βιταμίνη C, βιταμίνη E), παρόλο που η δομή τους διαφέρει από αυτή των φαινολικών οξέων και των φλαβονοειδών.

Τέλος, μια επιπλέον ικανότητα ορισμένων φυτοχημικών είναι να εμφανίζουν προ-οξειδωτική δράση, η οποία θεωρείται υπεύθυνη για την εμφάνιση κυτταροτοξικότητας (Heim *et al.*, 2002). Συγκεκριμένα, κάποια φυτοχημικά (π.χ. φαινολικά οξέα) όταν υπάρχουν μέσα στα κύτταρα σε μεγάλες συγκεντρώσεις και κάτω από ορισμένες συνθήκες μπορούν να εμφανίσουν προ-οξειδωτική, τοξική δράση (Rucinska *et al.*, 2007). Έχει παρατηρηθεί ότι τα φαινολικά οξέα έχουν την ικανότητα να επάγουν τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, ενώ μπορεί να μεταβολιστούν από την υπεροξειδάση προς προ-οξειδωτικές ρίζες και - καθώς είναι αρκετά δραστικά - να συνοξειδώνουν το GSH ή το NADH που σε συνδυασμό με επαρκή πρόσληψη οξυγόνου, να το μετατρέπουν σε ROS (Galati *et al.*, 2002). Τελικό αποτέλεσμα αυτής της δράσης είναι η καταστροφή των μακρομορίων και για αυτό το λόγο μπορούν να θεωρηθούν αντικαρκινικοί παράγοντες, δια των οποίων να προκαλείται η απόπτωση καρκινικών κυττάρων

Δραστικές ενώσεις οξυγόνου και αζώτου στην καρκινογένεση

Το παρατεταμένο οξειδωτικό στρες και η αυξημένη παραγωγή ROS είναι κάποια από τα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων, κάτι που έχει επαληθευτεί τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* πειράματα (Szatrowski & Nathan, 1991, Toyokuni *et al.*, 1995, Brown & Bicknell, 2001). Ως εξήγηση για την αυξημένη παραγωγή των ROS και RNS στα καρκινικά κύτταρα, έχει προταθεί η υποξία που επικρατεί στους όγκους. Επίσης, στα καρκινικά κύτταρα παρατηρείται αύξηση του μεταβολισμού της γλυκόζης, γεγονός που μπορεί να συνδεθεί με αυξημένη παραγωγή O_2^- (Spitz *et al.*, 2000).

Βλάβες που προκαλούνται από τις ROS και RNS σχετίζονται κυρίως με τη δομή και τη λειτουργία του κυττάρου μέσω των αλλοιώσεων που προκαλούν σε σημαντικά για το κύτταρο βιομόρια (DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες). Από μελέτες έχει βρεθεί ότι πολλές από τις βλάβες που προκαλούν οι ROS σχετίζονται με αλλοιώσεις του γενετικού υλικού των κυττάρων και αυτός είναι και ο λόγος που η καρκινογένεση θεωρείται εκφυλιστική ασθένεια (Ames, 1989). Από όλες τις ενώσεις που συγκαταλέγονται στις δραστικές ενώσεις οξυγόνου, η δράση του $\cdot OH$ είναι αυτή που θεωρείται η πιο σημαντική για την καρκινογένεση. Έχει προταθεί ότι το $\cdot OH$ μπορεί να επηρεάσει με πολλούς τρόπους την φάση έναρξης της καρκινογένεσης, κυρίως μέσω της απενεργοποίησης ογκοκατασταλτικών γονιδίων ή της ενεργοποίησης ογκογονιδίων, χημικών καρκινικών παραγόντων, ενώ τέλος αναστέλλει τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA (Dreher & Junod, 1996, Klaunig *et al.*, 1998). Επειδή οι μεταλλάξεις συμβαίνουν τυχαία, μόνο αυτές συγκεκριμένων γονιδίων σε κύτταρα που πολλαπλασιάζονται είναι ικανές να οδηγήσουν στην ανάπτυξη καρκίνου.

Στη φάση της προαγωγής, οι ROS μπορούν να επάγουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων επηρεάζοντας τα γονίδια που έχουν σχέση με την κυτταρική απόπτωση και τον πολλαπλασιασμό. Επίσης, είναι γνωστό ότι οι ROS μπορούν να οδηγήσουν σε αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} , το οποίο με τη σειρά του μπορεί να οδηγήσει στην ενεργοποίηση πρωτο- ογκονιδίων (όπως c-fos, c-jun και c-myc) καθώς και στην ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C. Αποτέλεσμα όλων αυτών είναι η αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και η προαγωγή του όγκου (Dreher & Junod, 1996).

Στη φάση της εξέλιξης, οι Malins και συνεργάτες πρότειναν ότι οι φαινότυποι που είναι αποτέλεσμα της επίδρασης του $\cdot\text{OH}$ στο DNA έχουν αυξημένη ικανότητα να προκαλούν μεταστάσεις, αφού βρήκαν κατά δύο φορές αυξημένες βλάβες στο DNA μεταστατικών κυττάρων του καρκίνου του στήθους που προκαλούνται από το $\cdot\text{OH}$, σε σχέση με το DNA μη μεταστατικών όγκων (Malins *et al.*, 1996).

Όσον αφορά τις αλλοιώσεις σε λιπίδια οι πιο σημαντικές είναι σε αυτά που αποτελούν συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης, με τα πολυακόρεστα λιπίδια να είναι πιο επιρρεπή σε οξειδωτικές αλλαγές (Marnett, 2000). Αποτέλεσμα αυτού είναι η καταστροφή ή η εξασθένιση της δομής και της λειτουργίας της κυτταρικής μεμβράνης ενώ παράγονται αλδεύδες ή/και κετόνες λόγω της οξείδωσης των λιπαρών οξέων (π.χ. μαλοναλδεύδη MDA) (Klaunig *et al.*, 1998, Marnett, 2000).

Τέλος, οι ROS και RNS μπορούν να προκαλέσουν βλάβες σε πρωτεΐνες είτε άμεσα είτε έμμεσα, μέσω οξειδωμένων λιπών (Klaunig *et al.*, 1998). Πρωτεΐνες «στόχοι» αποτελούν κυρίως η DNA πολυμεράση και ένζυμα που λαμβάνουν μέρος σε αντιδράσεις επιδιόρθωσης του DNA (Wiseman *et al.*, 1996). Τα αποτελέσματα από τη δράση των ROS στις πρωτεΐνες είναι η τροποποίηση της ενζυμικής δραστηριότητας, η καταστροφή διαμεμβρανικών μεταφορέων, οι αλληλεπιδράσεις με υποδοχείς, που έχουν καταστρεπτικές συνέπειες για το κύτταρο (Klaunig *et al.*, 1998).

Λαμβάνοντας όλα τα παραπάνω υπόψη γίνεται κατανοητό ότι ουσίες, όπως τα φυτοχημικά, που παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές ικανότητες εναντίων των ROS και RNS είναι πολύ σημαντικές για την προστασία των οργανισμών από βλάβες και ασθένειες

1.4.2 Αναστολή κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Η κυτταρική ανάπτυξη και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός είναι αυστηρά ελεγχόμενες διαδικασίες. Για να συμβεί αυτό είναι απαραίτητες: οι συντονισμένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυκλινο-εξαρτώμενων πρωτεϊνικών κινασών (cyclin-dependent kinases, Cdk 1, 2, 4 ή 6), η ρύθμιση των υπομονάδων κυκλίνης (cyclin A, B, Ds ή E) και η δράση πρωτεϊνικών αναστολέων, όπως

p21^{WAF1} και

p27KIP1 (Murray,

2004, Alao, 2007).

Η συντονισμένη

λειτουργία των

κυκλίνηDs/Cdk4/6

κυκλίνηE/Cdk2

και

κυκλίνηA/Cdk2

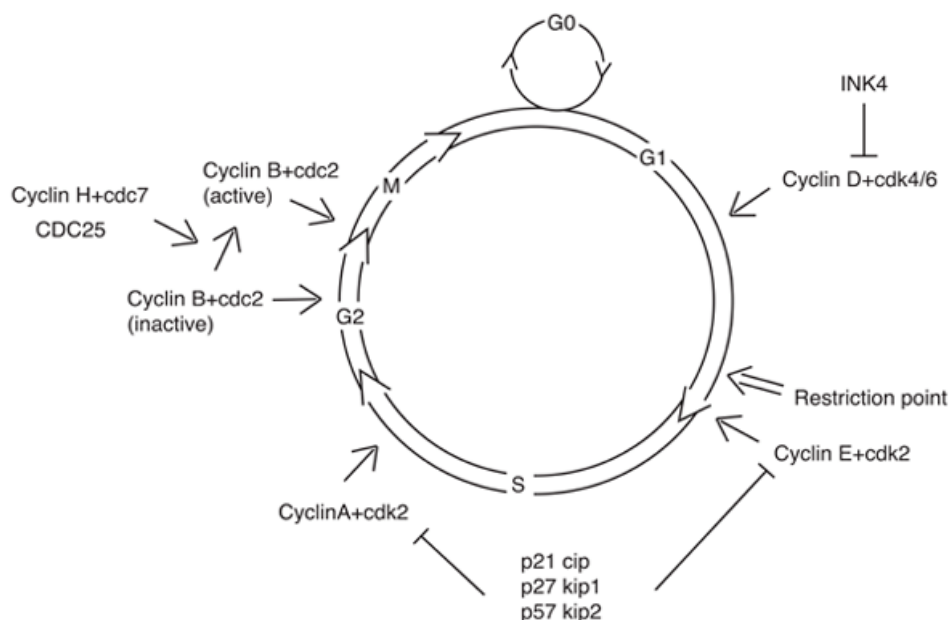
είναι απαραίτητη

για τη G1/S

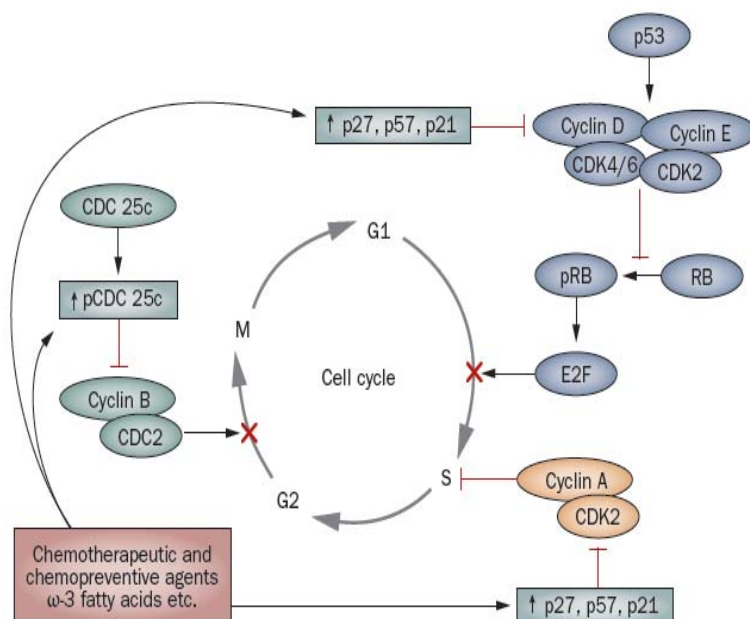
μετάβαση στη **Εικόνα 1.12** Στάδια κυτταρικού κύκλου

φάση S (φάση

αντιγραφής του DNA), ενώ οι δράσεις των Cdk1/κυκλίνη A και B είναι απαραίτητες για τη μετάβαση στη φάση M (φάση μιτωτικής διαίρεσης του κυττάρου) (Εικόνα 1.12). Για τη G1/S μετάβαση απαιτείται η ενεργοποίηση των κυκλίνηD/Cdk4/Cdk6 και κυκλίνηE/Cdk2 συμπλόκων, ενώ στη συνέχεια φωσφορυλιώνεται η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (pRP).



Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι πολλά από τα φυτοχημικά μπορούν να επηρεάσουν τη διαδικασία της κυτταρικής ανάπτυξης (Εικόνα 1.13). Η ρεσβερατρόλη έχει βρεθεί να επιδρά τις συγκεντρώσεις σημαντικών μορίων του κυτταρικού κύκλου, με αποτέλεσμα να διακόπτεται η κυτταρική ανάπτυξη στη φάση G1/S. Η δράση αυτή της ρεσβερατρόλης περιλαμβάνει την



επαγωγή των p21WAF1 και p27KIP1, την απορύθμιση των

Εικόνα 1.13 Αναστολή του κύκλου κυτταρικής ανάπτυξης από τα φυτοχημικά και άλλους χημειοπροστατευτικούς παράγοντες.

κυκλινών D1/D2/E και των Cdk2/4/6, καθώς και την υπερφωσφορυλίωση της pRb (Adhami *et al.*, 2001, Ahmad *et al.*, 2001, Kim *et al.*, 2006). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η ρεσβερατρόλη μπορεί να παρεμποδίσει την κυτταρική ανάπτυξη στις φάσεις S και G2/M μέσω της αναστολής των Cdk7 και p34Cdc2 (Joe *et al.*, 2002, Pozo-Cuisado *et al.*, 2002, Estrov *et al.*, 2003, Liang *et al.*, 2003). Ο Benitez και οι συνεργάτες του (2007) έδειξαν ότι η ρεσβερατρόλη μπορεί να επηρεάσει την έκφραση της κυκλίνης B και Cdk1 καθώς και την δραστηρότητά τους και κατά συνέπεια και την κυτταρική ανάπτυξη, σε κύτταρα καρκίνου του προστάτη. Επιπλέον, η ρεσβερατρόλη μπορεί να αναστείλει τη σύνθεση του DNA μειώνοντας την δραστηρότητα της αναγωγάσης των ριβονουκλεοτιδίων και της DNA πολυμεράσης (Fontecave *et al.*, 1998, Sun *et al.*, 1998). Γενικά, η ρεσβερατρόλη έχει την ικανότητα να επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω της ρύθμισης της δραστηρότητας πολλών μορίων που λαμβάνουν μέρος στον κυτταρικό κύκλο, γεγονός που μπορεί να εξαρτάται τόσο από τη συγκέντρωση της όσο και από τα χαρακτηριστικά των κυττάρων- στόχων (Ahmad *et al.*, 2001 Pozo-Cuisado *et al.*, 2002, Lin *et al.*, 2002, Estrov *et al.*, 2003, Signorelli *et al.*, 2005).

Τα τερπένια έχουν επίσης την ικανότητα να παρεμποδίζουν την κυτταρική ανάπτυξη και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η έρευνα του Zhang και των συνεργατών του (2005) ανέδειξε την ικανότητα τους να περιορίζουν την κυτταρική ανάπτυξη και να επάγουν την απόπτωση καρκινικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, η τουσενδανίνη, ένα τριτερπενοειδές παράγωγο, μπορεί να επηρεάζει την ανάπτυξη αυξάνοντας το ποσοστό των κυττάρων στη φάση S του κυτταρικού

κύκλου καθώς και να μειώσει το ποσοστό των κυττάρων τα οποία βρίσκονται στη φάση G0/G1, σε *in vitro* δοκιμές.

Το λυκοπένιο, ένα καροτενοειδές που υπάρχει σε μεγάλες συγκεντρώσεις στην τομάτα, επίσης μπορεί να αναστείλει την κυτταρική ανάπτυξη. Υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί να αναστείλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε πολλές κυτταρικές σειρές, κυρίως του προστάτη, μέσω της απορύθμισης και μείωσης των κυκλινών D1 και E με αποτέλεσμα τα κύτταρα να παραμένουν στη φάση G0/G1 του κυτταρικού κύκλου (Ivanov *et al.*, 2007, Syed *et al.*, 2007).

Οι κατεχίνες, πολυφαινόλες που απαντούν σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο τσάι, έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ο γαλλικός εστέρας της επιγαλλοκατεχίνης (EGCG) περιορίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω αναστολής ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις της αντιγραφής του DNA. Αναστέλλει επίσης μονοπάτια της ενδοκυτταρικής επικοινωνίας που απαιτούνται για το διαχωρισμό του κυττάρου. Επιπρόσθετα, μπορεί να σχηματίζει εστερικούς δεσμούς με το πρωτεόσωμα αναστέλλοντας το, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση υποστρωμάτων του και συγκεκριμένα της p27KIP1. Τα κύτταρα λοιπόν παραμένουν στη φάση G1 του κύκλου ανάπτυξης. Τέλος, η EGCG επάγει τον αναστολέα κίνησης της κυκλίνης WAF1/p21 με αποτέλεσμα τα κύτταρα να παραμένουν στη φάση G0/G1 (Adhami *et al.*, 2003, Syed *et al.*, 2007).

Μελέτες έχουν δείξει ότι και κάποιες βιταμίνες μπορούν να δράσουν με παρόμοιο τρόπο. Σε *in vitro* έρευνες, σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη, έχει βρεθεί ότι η α- τοκοφερόλη, η βιοδραστική ισομορφή της βιταμίνης E, επάγει την παραμονή του κυτταρικού κύκλου ανάπτυξης στη φάση G1 ή στη φάση G2/M. Επιπλέον επάγει την απόπτωση, αναστέλλει τους υποδοχείς ανδρογόνων και την έκφραση της πρωτεΐνης του προστάτη PSA (prostate-specific antigen) (Beier *et al.*, 2000, Zhang *et al.*, 2002, Ni *et al.*, 2003).

Άλλα παραδείγματα φυτοχημικών που επιδεικνύουν την ικανότητα να διακόπτουν τον κυτταρικό κύκλο ανάπτυξης είναι η κερκετίνη και η απιγενίνη, που ανήκουν στα φλαβονοειδή. Για την κερκετίνη έχει βρεθεί ότι μπορεί να αναστείλει την κυτταρική ανάπτυξη στις φάσεις G2/M και G0/G1 (Ong *et al.*, 2004), ενώ η απιγενίνη στη φάση G2/M (Yin *et al.*, 2001).

1.4.3 Αντιφλεγμονώδης δράση

1.4.3.1 Γενικά στοιχεία

Πολλά από τα φυτοχημικά έχουν επιδείξει σημαντικές αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Η ικανότητά τους αυτή μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη όγκων αφού έχει βρεθεί ότι οι φλεγμονές -και μάλιστα οι χρόνιες- είναι αιτιολογικός επιγενετικός παράγοντας για την ανάπτυξη καρκίνου. Ο κύριος μηχανισμός της αντιφλεγμονώδους δράσης σχετίζεται με την παρεμπόδιση ενζύμων που διεγείρουν τη φλεγμονή, όπως οι κυκλοξυγονάσες (COX), οι λιποξυγονάσες (LOX), αλλά και άλλων παραγόντων όπως ο πυρηνικός παράγοντας kappa B (NF-κB), η συνθετάση του οξειδίου του αζώτου (NOS), η ενεργοποιούσα πρωτεΐνη-1 (AP-1) κ.α.

1.4.3.2 Αναστολή κυκλοξυγονασών (COX)

Οι κυκλοξυγονάση ή συνθετάση H των προσταγλανδινών είναι το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για τον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος, το οποίο απελευθερώνεται από την κυτταρική μεμβράνη, προς παραγωγή προσταγλανδινών (Aggarwal *et al.*, 2007). Οι προσταγλανδίνες είναι μόρια που έχουν την ικανότητα να διεγείρουν τη φλεγμονή, να ρυθμίζουν τη ροή του αίματος σε συγκεκριμένα όργανα, να ελέγχουν τη μεταφορά σιδήρου δια μέσου των μεμβρανών, να τροποποιούν τη συναπτική μεταβίβαση και να επάγουν τον ύπνο (Stryer *et al.*, 2004). Λόγω της ικανότητάς τους να διεγείρουν τη φλεγμονή γίνεται κατανοητό ότι αναστολή των υπεύθυνων για τη σύνθεσή τους ενζύμων είναι κρίσιμης σημασίας για την αναστολή της καρκινογένεσης.

Υπάρχουν δύο ισομορφές της συνθετάσης H των προσταγλανδινών. Η COX-1, η οποία είναι συστατικό όλων των κυττάρων παράγοντας προσταγλανδίνες σημαντικές για τη συσσώρευση αιμοπεταλίων καθώς και για τη διατήρηση της ακεραιότητας του γαστρικού βλεννογόνου. Η δεύτερη ισομορφή του ενζύμου αυτού είναι η COX-2. Η COX-2 επάγεται από προαγωγείς όγκων καθώς και από ενδογενείς κυτταροκίνες παράγοντας προσταγλανδίνες που εμπλέκονται σε διαδικασίες ανάπτυξης φλεγμονής (Johnson, 2007). Συνεπώς, η COX-2 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή καθώς η δράση της σχετίζεται με τη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης, την αναδιοργάνωση των ιστών και την καρκινογένεση. Η υπερέκφραση της συγκεκριμένης ισομορφής της κυκλοξυγονάσης έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή προφλεγμονωδών προσταγλανδινών, όπως η E2 (PGE2), πρωτεϊνικών αντιαποπτωτικών οικογενειών (Bcl-2), συγκεκριμένους παράγοντες καρκινογένεσης καθώς και την ενεργοποίηση του αντιαποπτωτικού μονοπατιού PI3K/AKT (Aravindaram & Yang, 2010). Τα τελευταία

χρόνια έχει αναφερθεί και ένα τρίτο ένζυμο η COX-3, ο φυσιολογικός του ρόλος όμως για τον οργανισμό δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί (Johnson, 2007).

Μέχρι σήμερα, πολλές ερευνητικές εργασίες έχουν δείξει ότι τα φυτοχημικά, κυρίως οι πολυφαινόλες, έχουν την ικανότητα να παρεμποδίζουν τη δραστικότητα των COX σε πρωτεϊνικό αλλά και σε μεταφραστικό επίπεδο. Ο EGCG αναστέλλει εκλεκτικά την έκφραση της COX-2 και την κυτταρική ανάπτυξη σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη (Hussain *et al.*, 2005). Η ίδια ένωση σε *in vitro* μελέτη φαίνεται να μειώνει την δραστικότητα της COX-2 σε επιθηλιακά κύτταρα που είχαν εκτεθεί σε ογκογενετικό παράγοντα (TPA) (Kundu *et al.*, 2003). Η κουρκουμίνη επίσης εμφανίζει αντιφλεγμονώδη δράση αναστέλλοντας τη δραστικότητα της COX-2 σε μεταφραστικό επίπεδο μέσω του NF-κΒ. Η κερκετίνη και οι μεταβολίτες της σε *in vivo* πειράματα φάνηκε να αναστέλλουν την ενζυμική δραστικότητα της COX-2 (O'Leary *et al.*, 2004). Η ρεσβερατρόλη, επίσης φάνηκε να αναστέλλει την έκφραση των COX σε πρωτεϊνικό και μεταφραστικό επίπεδο (Subbaramaiah *et al.*, 1998). Η γενιστεΐνη βρέθηκε ότι μπορεί να απορρυθμίζει την δραστικότητα του υποκινητή της COX-2 σε καρκινική σειρά του κόλου (Mutoh *et al.*, 2000). Η χρυσίνη, η καμπφερόλη και η απιγενίνη μπορούν να αναστείλουν τη μεταγραφή της COX-2 με διάφορους μηχανισμούς που περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα PPAR-γ και την αναστολή της έκφρασης του NF-κΒ (Liang *et al.*, 2001).

1.4.3.3 Αναστολή λιποξυγονασών (LOX)

Οι λιποξυγονάσες είναι επίσης ένζυμα που χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα το αραχιδονικό οξύ για την σύνθεση λευκοτριενίων και υδροξυ-οξέων. Το ένζυμο αυτό απαντά σε τρεις ισομορφές που επηρεάζουν με διαφορετικό τρόπο τα κύτταρα και τους ιστούς. Η 15-LOX συνθέτει τα αντιφλεγμονώδη 15-υδροξυ-εικοσατετραενοϊκά οξέα (HETEs), η 5,12-LOX σχετίζεται με φλεγμονώδεις/αλλεργικές ασθένειες και η 5-LOX παράγει 5-HETE και λευκοτριένια, τα οποία είναι χημειοτακτικοί παράγοντες που οδηγούν στην εμφάνιση άσθματος. Η 12-LOX συνθέτει 12-HETE, το οποίο συμβάλλει στην συσσώρευση αιμοπεταλίων και επάγει την φλεγμονώδη απόκριση (Yoon & Baek, 2005). Σημαντικοί αναστολείς του ενζύμου αυτού είναι κάποιες από τις πολυφαινόλες. Συγκεκριμένα, η καμπφερόλη, η κερκετίνη, η μυρισετίνη και μορίνη έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την δράση της 5-LOX (Laughton *et al.*, 1991). Την ίδια δράση έχουν και οι εστεροποιημένες με γαλλικό οξύ προανθοκυανιδίνες (Yoon & Baek, 2005). Η κερκετίνη βρέθηκε επίσης ότι αποτελεί αναστολέα της 12-LOX, σε μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος (Chi *et al.*, 2001). Τέλος, ο EGCG και η υδροξυτυροσόλη μπορούν να αναστέλλουν την δράση της LOX (Hong *et al.*, 2001, Huang *et al.*, 2009).

1.4.3.4 Αναστολή της συνθετάσης του οξειδίου του αζώτου (NOS)

Το οξείδιο του αζώτου είναι ένα διαλυτό αέριο και έχει την ικανότητα να λειτουργεί ως τοπικός διαμεσολαβητής σε πολλούς ιστούς, ενώ η δράση του σχετίζεται με αγγειοδιαστολή. Παράγεται με τη δράση μιας οικογένειας ενζύμων, της συνθετάσης του οξειδίου του αζώτου έχοντας ως υπόστρωμα την L- αργινίνη. Υπάρχουν τρεις ισομορφές του ενζύμου αυτού, η νευρική, η ενδοθηλιακή, οι οποίες αποτελούν δομικά συστατικά των κυττάρων και η επαγωγική, η οποία εκφράζεται μετά από επίδραση φλεγμονωδών ερεθισμάτων (π.χ. κυτταροκινών όπως γ-INF, TNF-α, IL-1), με τις δυο πρώτες να εξαρτώνται από το ασβέστιο, ενώ η τρίτη όχι. Ενώ και οι τρεις ισομορφές έχουν την ικανότητα να συνθέτουν οξείδια του αζώτου, η επαγωγική παράγει τις μεγαλύτερες ποσότητες (Lim *et al.*, 2001, Lowenstein & Padalko, 2004). Διάφορα παράγωγα φλαβονοειδών, όπως η απιγενίνη, η κερκετίνη και η μορίνη εμποδίζουν την σύνθεση του οξειδίου του αζώτου (Soliman & Mazzio, 1998). Επίσης, η ρεσβερατρόλη και ο EGCG εμποδίζουν την έκφραση της NOS, πιθανώς μέσω αναστολής του NF-κΒ (Lin & Lin, 1997, Tsai *et al.*, 1999).

1.4.3.5 Προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες

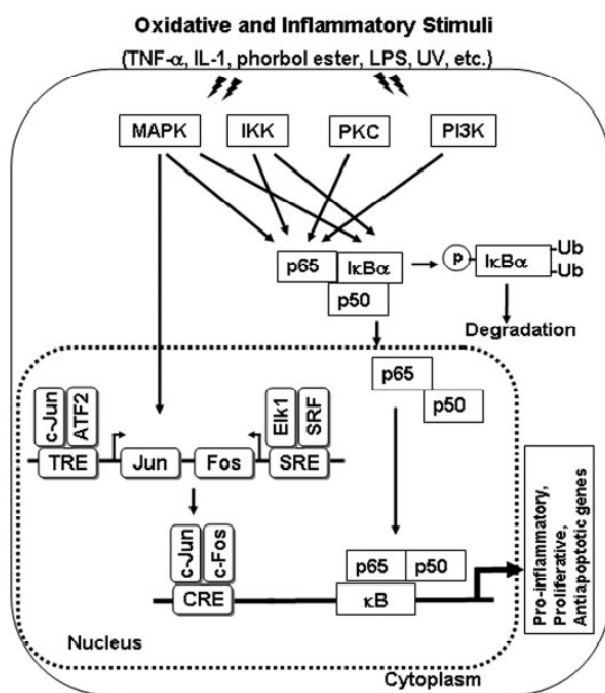
Σε καταστάσεις φλεγμονής τα επίπεδα προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως IL-1β, IL-6, IL-10, IL-11 και TNF-α έχουν βρεθεί αυξημένα, γεγονός που σχετίζεται με την έναρξη και την εγκατάσταση της φλεγμονής. Επίσης, έχει βρεθεί ότι αυτές οι χημειοκίνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην απόπτωση, τον πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση και τη μετάσταση των όγκων (Aravindaram & Yang, 2010). Συνεπώς, παράγοντες που μπορούν να μειώσουν τα επίπεδά τους ή να εμποδίσουν την έκκριση τους, χαρακτηρίζονται ως αντιφλεγμονώδεις παράγοντες (Suganuma *et al.*, 2006).

Πολλά είναι τα φυτοχημικά που έχει βρεθεί να παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη δράση, τα περισσότερα εκ των οποίων ανήκουν στην τάξη των πολυφαινόλων. Ο τρόπος που αυτές οι ουσίες εμφανίζουν αντιφλεγμονώδη δράση είναι πολύπλοκος και περιλαμβάνει πολλούς μηχανισμούς. Σε *in vitro* μελέτες βρέθηκε ότι το καφεϊκό οξύ και η ολευρωπαΐνη μπορούν να μειώνουν τη συγκέντρωση της IL-1β, χωρίς όμως καμία επίδραση στην IL-6 και τον TNF-α (Miles *et al.*, 2005). Ο EGCG και άλλα φαινολικά συστατικά του τσαγιού βρέθηκε ότι μπορούν να παρεμποδίσουν την δράση του TNF-α και μάλιστα με δόσοεξαρτώμενο τρόπο (Okabe *et al.*, 1999).

1.4.3.6 Πυρηνικός παράγοντας kappa B (NF-κB)

Ο NF-κB είναι μια διμερής πρωτεΐνη που λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας. Το διμερές αυτό μόριο σχηματίζεται από την ένωση συγκεκριμένων πρωτεϊνών της οικογένειας Rel (p65/RelA, c-Rel, RelB, p52 p50) (Shanmugam *et al.*, 2011). Στην ανενεργή του μορφή βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα ως σύμπλοκο με μια ρυθμιστική πρωτεΐνη, την IκB. Η ενεργοποίηση του προκαλείται από στρες που οφείλεται σε φλεγμονή (LPS, TNF-α κ.α.) καθώς και από οξειδωτικό στρες.

Αρχικά, η IκB φωσφορυλιώνεται από την κινάση της (IKK) ή από τις MAP κινάσες, γεγονός που οδηγεί στην ουβικιτινίωση της και κατά συνέπεια σε αποδόμησή της από το πρωτεόσωμα. Μετά την απελευθέρωση του ο NF-κB μεταφέρεται στον πυρήνα όπου και συνδέεται στο DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες (κB) (Εικόνα 1.14). Ο NF-κB



Εικόνα 1.14 Σχηματική απεικόνιση της ενεργοποίησης του NF-κB

λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας για τουλάχιστον 200 γονίδια που σχετίζονται με την φλεγμονή, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση (Johnson, 2007). Συγκεκριμένα, τα γονίδια που εκφράζονται μέσω της δράσης του NF-κB και έχουν σχέση με την φλεγμονή είναι: κυτταροκίνες, χημειοκίνες, μόρια συγκόλλησης καθώς και τα ένζυμα COX, NOS κ.α. (Moore *et al.*, 1999, Gonda *et al.*, 2009). Το μόριο αυτό βρίσκεται ενεργοποιημένο σε πολλούς όγκους και διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη φλεγμονή, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο NF-κB είναι σημαντικό μόριο στην καρκινογένεση και συγκεκριμένα στις φάσεις προαγωγής και εξέλιξης του όγκου (Karin *et al.*, 2002).

Πολλά είναι τα φυτοχημικά που έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την δράση του NF-κB, επηρεάζοντας διάφορα στάδια του ρυθμιστικού του μονοπατιού. Κάποια από αυτά είναι η ρεσβερατρόλη, το λιμονένιο, η απιγενίνη, η γενιστεΐνη κ.α. Για παράδειγμα, η κουρκουμίνη καταστέλλει την επαγόμενη από TNF ενεργοποίηση της IKK (Singh & Aggarwal, 1995). Ο φαινολικός εστέρας του καφεϊκού οξέος εμποδίζει τη δέσμευση του NF-κB στις αλληλουχίες του DNA (Natarajan *et al.*, 1996). Επίσης, εστέρες του καφεϊκού οξέος και η ρεσβερατρόλη έχει δείχθει ότι είναι ικανοί να μειώνουν τη δραστηριότητα του (Montpied *et al.*, 2003, Birrell *et al.*, 2005).

1.4.3.7 Ενεργοποιούσα πρωτεΐνη- 1(AP-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). Σημεία σύνδεσης αυτού του μεταγραφικού παράγοντα στο DNA εντοπίζονται στις αλληλουχίες του υποκινητή πολλών γονιδίων. Κάποια από τα γονίδια που υπόκεινται της ρύθμισης από τον AP-1 είναι παράγοντες ανάπτυξης, κυτταροκίνες, ογκοπρωτεΐνες, μόρια που όλα εμπλέκονται στην επιβίωση και τη διαφοροποίηση των κυττάρων καθώς και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Μελέτες επίσης έχουν δείξει ότι η ενεργοποίηση του AP-1 σχετίζεται με την προαγωγή και την εξέλιξη του καρκίνου (Eferl & Wagner, 2003).

Πολλά από τα φυτοχημικά έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν και αυτόν το μεταγραφικό παράγοντα, με ποικίλους τρόπους. Η κουρκουμίνη αναστέλλει την AP-1 απευθείας, αποτρέποντας τη δέσμευσή της στις θέσεις στόχου του DNA (Bierhaus *et al.*, 1997). Επίσης σε *in vitro* πειράματα, σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη, η ίδια ουσία μπορεί να αναστείλει την δραστικότητα της AP-1 (Nakamura *et al.*, 2002). Η ρεσβερατρόλη βρέθηκε ότι αναστέλλει την επαγόμενη από TNF-α ενεργοποίηση της AP-1 σε *in vitro* πειράματα (Manna *et al.*, 2000). Η εσπεριδίνη, επίσης έδειξε να αναστέλλει την δράση της AP-1 σε καρκινικά κύτταρα του ήπατος (Yeh *et al.*, 2009). Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και σε *in vivo* πειράματα μετά από την επίδραση με ρεσβερατρόλη και καφεϊκό οξύ (Staniforth *et al.*, 2006, Kundu *et al.*, 2006).

1.4.4 Μεταγωγείς σήματος και ενεργοποιητές μεταγραφής (STAT)

Έχει βρεθεί ότι τα φυτοχημικά μπορούν να ρυθμίσουν την οικογένεια των πρωτεϊνών STAT (Yu *et al.*, 2009). Οι πρωτεΐνες αυτές ενεργοποιούνται με φωσφορυλίωση από την janus κινάση (JAK) ή υποδοχείς κυτταροκινών, υποδοχείς G-πρωτεϊνών ή υποδοχείς παραγόντων αύξησης (όπως EGFR) κ.α. (Yu *et al.*, 2009). Υπάρχουν επτά ισομορφές των STAT πρωτεϊνών (STAT1-7), εκ των οποίων οι STAT3 και STAT5 εμπλέκονται σε πολλούς τύπους καρκίνου (Aggarwal *et al.*, 2009). Αυτές οι δύο ισομορφές των πρωτεϊνών STAT συμβάλουν στην επιβίωση και διαφοροποίηση των κυττάρων αναστέλλοντας την απόπτωση μέσω αύξησης της έκκρισης προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως Bcl-2 και Bcl-XL (Aggarwal *et al.*, 2006).

Έχει βρεθεί ότι η κουρκουμίνη αναστέλλει την επαγόμενη από IL-6 φωσφορυλίωση της STAT3 και επομένως την μεταφορά της στον πυρήνα (Bharti *et al.*, 2003). Η ρεσβερατρόλη μπορεί επίσης να αναστείλει την ενεργοποίηση της STAT3 μέσω της επίδρασής της στη

δραστικότητα της κινάσης της τυροσίνης (Kotha *et al.*, 2006, Bhardwaj *et al.*, 2007). Η βουτεΐνη έχει την ικανότητα να παρεμποδίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω της αναστολής της φωσφορυλίωσης της STAT3 (Pandey *et al.*, 2009). Η λουτεΐνη επάγει την αποικοδόμηση της STAT3 σε ηπατικά κύτταρα, γεγονός που οδηγεί σε μείωση της κυκλίνης D1 και Bcl-XL, τα γονίδια των οποίων αποτελούν στόχους της (Selvendiran *et al.*, 2006). Η καμπερόλη βρέθηκε ότι μπορεί να αναστέλλει την ενεργοποίηση της STAT1 (Hamalainen *et al.*, 2007). Τέλος η στυλιβίνη, αναστέλλει την ενεργοποίηση της STAT3 σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη DU145, ενώ έχει αναφερθεί ότι μπορεί να καταστείλει την ανάπτυξη του όγκου τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (Singh *et al.*, 2008).

1.4.5 Παράγοντες ανάπτυξης

Οι παράγοντες ανάπτυξης είναι πρωτεΐνες, στεροειδή, ή άλλες βιοχημικές ουσίες οι οποίες μπορούν να προσδεθούν σε συγκεκριμένους υποδοχείς στην επιφάνεια του κυττάρου και με αυτό τον τρόπο, μέσω ενός σηματοδοτικού μονοπατιού, να διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων ή ιστών στόχων. Οι παράγοντες ανάπτυξης μπορούν να δράσουν ως σηματοδοτικά μόρια μεταξύ δυο διαφορετικών κυτταρικών τύπων και είναι σημαντικοί για την ρύθμιση ποικίλων κυτταρικών διαδικασιών. Πολλοί από τους παράγοντες ανάπτυξης διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην καρκινογένεση και τη μετάσταση του όγκου, π.χ. FGF, EGF, VEGF, IGF, TGF κ.α. (Aravindaram & Yang, 2010). Ουσίες λοιπόν που μπορούν να επηρεάσουν αυτούς τους παράγοντες μπορεί να θεωρηθούν ότι έχουν αντικαρκινική δράση. Η κουρκουμίνη έχει βρεθεί ότι αναστέλλει την έκφραση του EGFR σε καρκινικά κύτταρα του κόλου και του προστάτη, επάγοντας με αυτόν τον τρόπο την απόπτωση (Hong *et al.*, 1999, Patel *et al.*, 2008). Επίσης η γενιστεΐνη παρεμποδίζει την ενεργοποίηση του EGFR σε καρκινικά κύτταρα του μαστού αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (Mai *et al.*, 2007).

1.5 Ελληνικά φαρμακευτικά φυτά

Η Ελλάδα χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα πλούσια χλωρίδα που προκαλεί το ενδιαφέρον των επιστημών, αναφορικά με τις ιδιότητές της. Ωστόσο, τα δεδομένα που έχουν συλλεχθεί είναι ακόμα ελλιπή και πολλές είναι ακόμα οι μελέτες που πρέπει να γίνουν. Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας μελετήθηκε το αντιοξειδωτικό περιεχόμενο και η δράση κάποιων βοτάνων σε σχέση με την ικανότητά τους να επηρεάζουν την βιωσιμότητα και την αναστολή του πολλαπλασιασμού σε καρκινικές κυτταρικές σειρές *in vitro*. Στην παρούσα

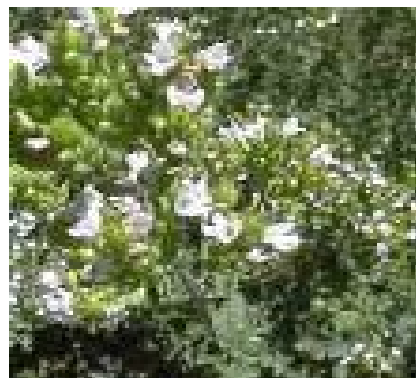
ενότητα θα παρουσιαστούν τα χαρακτηριστικά και η σύσταση των βοτάνων που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη.

Βότανα της οικογένειας Lamiaceae

A. Γένος *Origanum*: Στο γένος αυτό, της οικογένειας Lamiaceae συγκαταλέγονται 38 είδη τα οποία ευδοκούν στη λεκάνη της Μεσογείου, ωστόσο το 75% από αυτά απαντούν μόνο στην ανατολική Μεσόγειο. Στην Ελλάδα συναντάμε έντεκα είδη του γένους *Origanum*, πέντε από τα οποία είναι ενδημικά της Κρήτης. Στην πλειοψηφία τους τα φυτά αυτά χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα ως αρωματικά σε φαγητά και ροφήματα.

Origanum microphyllum:

Το φυτό αυτό είναι γνωστό με την κοινή ονομασία Αντωναΐδα. Όσον αναφορά τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του, είναι μικρού ύψους θαμνώδες φυτό. Συγκεκριμένα, είναι πολυετής μικρός θάμνος με πολλούς βλαστούς μήκους 20-50 εκατοστών, συνήθως διακλαδισμένους. Τα φύλλα των κύριων βλαστών έχουν μήκος 4-8 χιλιοστόμετρα, είναι ωοειδή προς επιμήκη, αμβλεία, στρογγυλεμένα στη βάση, ελάχιστα χνουδωτά ή με λευκό χνούδι και δυσδιάκριτες νευρώσεις. Η ταξιανθία εντοπίζεται στην άκρη του βλαστού ενώ η περίοδος ανθοφορίας είναι από Ιούνιο έως Σεπτέμβριο (Εικόνα 1.15). Είναι ενδημικό της Κρήτης και συγκεκριμένα το βρίσκουμε σε υψόμετρο 400-900 μέτρων στη Δυτική και Ανατολική Κρήτη (Δίκτη και στα Λευκά Όρη) (Aligiannis *et al.*, 2001). Οι οικότοποι στους οποίους αναπτύσσεται χαρακτηρίζονται από βραχώδεις περιοχές και σχισμές βράχων καθώς και ασβεστολιθικά δάση.



Εικόνα 1.15 *Origanum microphyllum*

Δεν είναι πολλές οι μελέτες που έχουν γίνει όσον αναφορά τη δράση του στην υγεία, με τις περισσότερες από αυτές να έχουν επικεντρωθεί στις δράσεις των συστατικών από τα αιθέρια έλαιά του. Τα αιθέρια έλαια από το φυτό αυτό αποτελούνται κυρίως από τερπένια (τερπεν-4-ολη, γ-τερπινένιο, α-τερπινένιο, τερπινολένιο, και *cis*- ή *trans*-σαβιδένιο) και από τερπενοειδή φαινολικά συστατικά (π.χ. καρβακρόλη) και παρουσιάζουν αντιμικροβιακές ικανότητες (Aligiannis *et al.*, 2001). Γενικά, χρησιμοποιείται σε μίγματα με άλλα βότανα (πιο συχνά με τσάι του βουνού) σε ροφήματα, προσδίδοντας γεύση λόγω της ευχάριστης μυρωδιάς που έχει. Σήμερα χρησιμοποιείται κυρίως ως τονωτικό που διεγείρει την όρεξη, τα πεπτικά υγρά, το συκώτι και τη χοληδόχο κύστη ενώ πιστεύεται ότι δρα εναντίον του κρυολογήματος και του πονόλαιμου.

Origanum dictamnus:

Η κοινή του ονομασία είναι Δίκταμος. Ο Δίκταμος είναι ενδημικό φρύγανο της Κρήτης και αυτοφύεται πρακτικά σε όλα τα βουνά του νησιού κι όχι μόνο στη Δίκτη όπως το θέλει το όνομά του. Εξαπλώνεται στα 300-1.500 μέτρα από το επίπεδο της θάλασσας, αποκλειστικά σε γκρεμούς και φαράγγια (υποχρεωτικό χασμόφυτο) αφού φαίνεται να προτιμά τα σκιερά μέρη. Είναι ένα μικρό φυτό με μήκος 30 έως 40 εκατοστά., πολύ δυνατής οσμής και γεύσης, τα φύλλα του είναι σχετικά μικρά αλλά παχουλά και καλύπτονται από χνούδι ενώ τα άνθη του έχουν βιολετί χρώμα (Εικόνα 1.16). Η περίοδος ανθοφορίας του διαρκεί από Ιούνιο έως Οκτώβριο.



Εικόνα 1.16 *Origanum dictamnus*

Το φυτό αυτό χρησιμοποιείται από την αρχαιότητα χάρις τις θεραπευτικές του ιδιότητες, κυρίως ως επουλωτικό. Επίσης, χαρακτηρίζεται ως αντιφλεγμονώδες, ανθελμινθικό, σπασμολυτικό αφροδισιακό κ.α. Το αφέψημα βοηθάει σε πόνους στο λαιμό και στο στομάχι, ενώ δρα κατά της ακμής, της διάρροιας και του πονοκεφάλου. Το γεγονός αυτό είχε προκαλέσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας από παλιά και έχουν πραγματοποιηθεί πλήθος ερευνών για διαπιστωθούν ποια είναι τα συστατικά του και που οφείλονται οι παρατηρήσεις αυτές. Έχει βρεθεί λοιπόν ότι το εκχύλισμα των φύλλων του είναι πλούσιο σε πλήθος φυτοχημικών, όπως πολυφαινόλες και τερπένια. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι περιέχονται: καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, π- κουμαρικό οξύ, κατεχίνες, απιγενίνη, κερκετίνη, καμπφερόλη, ναριγενίνη, ροσμαρινικό οξύ, θυμοκινίνη, τριτερπένια κ.α. μετά από εκχύλιση σε πολικούς και μη- πολικούς διαλύτες (Proestos *et al.*, 2008, Chatzopoulou *et al.*, 2010). Μελέτες έχουν γίνει για τον προσδιορισμό της σύστασης και του αιθέριου ελαίου από το φυτό αυτό. Οι ουσίες που βρέθηκαν σε μεγάλες συγκεντρώσεις ήταν η καρβακρόλη, το γ- τερπινένιο και το π- κιμένιο (Argyropoulou *et al.*, 2009, Liolios *et al.*, 2009).

Όσον αφορά τις θεραπευτικές του ιδιότητες πλήθος ερευνών έχουν επαληθεύσει την αντιμικροβιακή του δράση. Υδατικό εκχύλισμα του *Origanum dictamnus* βρέθηκε ότι μπορεί να αναστέλλει τη δράση του ζυμομύκητα *Yarrowia lipolytica* (Karanika *et al.*, 2001). Το μεθανολικό εκχύλισμα βρέθηκε ότι είναι δραστικό εναντίον των gram- αρνητικών βακτηριδίων *Acinebacter haemolyticus*, *Empedobacter brevis*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Klebsiella pneumonia* (Chatzopoulou *et al.*, 2010). Επίσης σε *in vitro* πειράματα επιβεβαιώθηκε και η ικανότητα του να θεραπεύει το γαστρικό έλκος. Συγκεκριμένα, υδατικό με 30% μεθανόλη εκχύλισμα βρέθηκε να αναστέλλει το *Helicobacter pylori* (Stamatis *et al.*, 2003).

Τέλος, σε έρευνα των Couladis και των συνεργατών του (2003), το αιθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του φυτού βρέθηκε να παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση παρόμοια με αυτήν της α-τοκοφερόλης.

Origanum majorana:

Το φυτό αυτό είναι γνωστό με την κοινή ονομασία Μαντζουράνα. Η μαντζουράνα είναι ένα πολυετές, αυτοφυές φυτό σε βραχώδεις περιοχές της Κρήτης και της Κύπρου, καλλιεργείται επίσης ευρέως και για καλλωπιστικούς σκοπούς. Ευδοκίμει σε εδάφη πλούσια που αποστραγγίζονται καλά. Προτιμά περιοχές με μάλλον ήπιο κλίμα. Παρουσιάζει μειωμένη αντοχή στο κρύο. Υπάρχουν πολλά είδη μαντζουράνας και χρησιμοποιούνται κυρίως στη μαγειρική. Ο βλαστός της είναι όρθιος, πολύκλαδος, σχεδόν λείος ύψους 20-50 εκατοστών. Τα φύλλα της είναι γκρι έως πράσινα μικρά, ωοειδή ή προμήκη με βραχύ μίσχο, τοποθετημένα αντίθετα (Εικόνα 1.17). Όλο το φυτό έχει σταχτοπράσινο χρώμα και βγάζει το καλοκαίρι ως τις αρχές φθινοπώρου, μικρά ασπρο-ρόδινα άνθη.



Εικόνα 1.17 *Origanum majorana*

Δεν είναι πολλές οι μελέτες που έχουν γίνει για τη διερεύνηση της δράσης του φυτού αυτού για την καταπολέμηση ασθενειών. Μέχρι στιγμής έχει προσδιοριστεί το συνολικό περιεχόμενο του αιθερίου ελαίου του φυτού σε φυτοχημικά. Τα κύρια συστατικά του είναι τερπινεν-4-ολη, α-τερπινεόλη και λινελοόλη. Παραδοσιακά χρησιμοποιείται για τη συμπτωματική θεραπεία των γαστρεντερικών διαταραχών και του βήχα. Παρουσιάζει επίσης σπασμολυτική και αντιμικροβιακή δράση και για αυτό το λόγο χρησιμοποιείται για την θεραπεία βρογχικών ασθενειών (Fecka & Turek, 2007). Επιπλέον, έχει διουρητικές και εφιδρωτικές ιδιότητες και βοηθάει στην αποβολή των ούρων. Τέλος, εφαρμόζεται τοπικά για την ανακούφιση των συμπτωμάτων του κοινού κρυολογήματος, όπως ρινικές εκκρίσεις, και ως στοματικό διάλυμα για τη στοματική υγιεινή (Bruneton, 1999).

Origanum vulgare:

Το είδος αυτό είναι η κοινή Ρίγανη. Το βότανο αυτό είναι πολυετές φυτό, με ύψος μέχρι 60 εκατοστά και βλαστό εν μέρει ξυλώδη και χνουδωτό. Τα φύλλα είναι μικρά αντίθετα και οδοντωτά ενώ τα άνθη είναι μικρά και έχουν χρώμα μοβ-λευκό (Εικόνα 1.18). Απαντάται σε ολόκληρη την λεκάνη της Μεσογείου. Στην Ελλάδα η ρίγανη είναι αυτοφυής και βρίσκεται σε ορεινές και βραχώδεις περιοχές, είναι δε εξαιρετικής ποιότητας και θεωρείται από τις καλύτερες στον κόσμο. Ανθίζει αργά το καλοκαίρι ή αργά το φθινόπωρο. Χρησιμοποιούνται τα φύλλα και τα άνθη σε νωπή μορφή ή αποξηραμένα και τριμμένα. Εξαιρετικό μυρωδικό χρησιμοποιείται σε πολλές σάλτσες και σαλάτες, ενώ αρωματίζει ευχάριστα κρέατα, ψάρια, τηγανητές πατάτες, λαχανικά κ.α. (Singletary, 2010).



Εικόνα 1.18 *Origanum vulgare*

Η φαρμακευτική χρήση της ρίγανης χρονολογείται από την αρχαιότητα, όπου και χρησιμοποιούνταν για την επούλωση τραυμάτων και ως αντισηπτικό. Στην Ελλάδα, το ρόφημα ρίγανης ακόμα καταναλώνεται για την καταπολέμηση του κρυολογήματος, για πόνους στο στομάχι και γενικά για τη διατήρηση της καλής υγείας (Clark, 1997).

Όσον αφορά τη σύσταση της, το φαινολικό της κλάσμα αποτελείται από καφεϊκό οξύ, π-κουμαρικό οξύ, ροσμαρινικό οξύ και διάφορα φλαβονοειδή (Shan *et al.*, 2005). Αντίστοιχα, στο εκχύλισμα από το αιθέριο έλαιο της περιέχει μεγάλες ποσότητες τερπενίων και συγκεκριμένα, καρβακρόλης, θυμόλης, π-κυμενίο, γ-τερπινένιο, τα οποία αποτελούν και πρόδρομα μόρια για τη βιοσύνθεση της καρβακρόλης και της θυμόλης (Russo *et al.*, 1998, Hazzit *et al.*, 2006, Figueredo *et al.*, 2006).

Η ρίγανη και τα συστατικά της έχουν συγκεντρώσει την προσοχή πλήθους ερευνητών που πραγματοποίησαν μελέτες για την κατανόηση και εξακρίβωση των ευεργετικών τους αποτελεσμάτων στην υγεία. Η ρίγανη και μερικά από τα συστατικά της έχει βρεθεί ότι καταστέλλει μικροοργανισμούς που προκαλούν αλλοιώσεις σε τρόφιμα σε *in vitro* πειράματα. Τόσο το αιθέριο έλαιο όσο και εκχύλισμα από φύλλα ρίγανης μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη gram-θετικών και gram-αρνητικών βακτηρίων, ζυμομυκήτων και κάποιων μυκήτων, σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 0,4-4000 $\mu\text{g/mL}$ ανάλογα με τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε και το είδος του μικροοργανισμού (Lopez *et al.*, 2007). Επίσης, σχετικά με την αντιμικροβιακή ικανότητα του φυτού αυτού, βρέθηκε ότι μπορεί να αναστέλλει την ανάπτυξη

του *Helicobacter pylori* που ευθύνεται για την γαστρίτιδα στον άνθρωπο καθώς και άλλων παρασίτων του εντερικού αυλού, σε *in vivo* πειράματα με ποικίλες συγκεντρώσεις (Bampidis *et al.*, 2006).

Πολλοί είναι οι ερευνητές που έχουν βρει ενδείξεις ότι εκχυλίσματα ρίγανης και τα συστατικά της έχουν θετική δράση στην καταστολή της φλεγμονής *in vivo* και *in vitro*. Για παράδειγμα, οι Braga και συνεργάτες (2006) βρήκαν ότι η θυμόλη, σε συγκέντρωση 2,5-20μg/mL αναστέλλει την απελευθέρωση της ελαστάσης, ενός δείκτη φλεγμονής, από ανθρώπινα ουδετερόφιλα μετά από διέγερσή τους με ένα χημειοτακτικό πεπτίδιο.

Επιπρόσθετα, το εκχύλισμα ρίγανης βρέθηκε ότι παρουσιάζει ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα, μέσω δέσμευσης των ελευθέρων ριζών, καταστολή της οξειδωσης λιπών, αναστολής της δραστηριότητας της NOS και προστασίας του DNA από την H₂O₂ επαγόμενη οξειδωτική βλάβη (Zheng & Wang, 2001, Aherne *et al.*, 2007, Tsai *et al.*, 2007). Τα συστατικά στα οποία αποδίδεται η ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα της ρίγανης είναι η καρβακρόλη, το γ-τερπινένιο, το ροσμαρινικό οξύ, γλυκοζίτες του πυροκατεχικού οξέος και η θυμόλη (Karioti *et al.*, 2006, Braga *et al.*, 2006).

Επιπλέον, έχουν γίνει αρκετές μελέτες για την ικανότητα συστατικών της ρίγανης να καταστέλλουν όγκους. Σε *in vitro* πειράματα με καρκινικές κυτταρικές σειρές, η επίδραση εκχυλίσματος ρίγανης βρέθηκε ότι προστατεύει έναντι του οξειδωτικού στρες και την καταστροφή του DNA από την ακτινοβολία (Rao *et al.*, 2006, Bakkali *et al.*, 2006). Η καρβακρόλη και η θυμόλη, επίσης, προστατεύουν το DNA από παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν βλάβη, ενώ και οι δύο αυτές ουσίες μπορούν να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων ή κυττάρων με ενεργά ογκογονίδια (Sasaki *et al.*, 2005, Slamenova *et al.*, 2007, Mezzoug *et al.*, 2007). Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι έχουν γίνει μελέτες που καταδεικνύουν ότι το εκχύλισμα της ρίγανης έχει καρδιοπροστατευτική δράση καθώς και προστασία έναντι του διαβήτη, αφού έχει φανεί ότι είναι ικανό να ρυθμίσει την γλυκόζη και τα λιπίδια του αίματος, ωστόσο πρέπει να γίνουν και άλλα πειράματα για να επιβεβαιωθούν αυτές οι δράσεις (Lemhadri *et al.*, 2004, Talpur *et al.*, 2005, Kwon *et al.*, 2006).

B. Γένος *Rosmarinus*

Rosmarinus officinalis:

Η κοινή του ονομασία είναι Δενδρολίβανο. Μορφολογικά, το φυτό αυτό είναι ένας αρωματικός, πράσινος, αειθαλής, θάμνος με όρθιο πολύκλαδο βλαστό, ύψους 1-2 μέτρων και σκληρά, δερματώδη, βελονοειδή φύλλα με 2.5 εκατοστά μήκος, με πράσινο χρώμα από πάνω και ασημί στο κάτω μέρος τους. Τα άνθη του είναι μικρά κυανόλευκα, σωληνοειδή, συγκεντρωμένα κατά μήκος του ακραίου τμήματος των βλαστών σε σπονδύλους, στις μασχάλες των φύλλων (Εικόνα 1.19). Υπάρχει αυτοφυές σε ορεινές περιοχές συνήθως στην



Εικόνα 1.19 *Rosmarinus officinalis*

Πελοπόννησο, στην Εύβοια και στα νησιά. Γενικά, αναπτύσσεται σε περιοχές με ήπιο, θερμό αλλά και ψυχρό κλίμα αλλά καλύτερα σε ηλιόλουστες περιοχές, σε υψόμετρο από πεδινές περιοχές έως 600 μέτρα. Η περίοδος ανθοφορίας του είναι άνοιξη – καλοκαίρι.

Μέχρι και σήμερα το δεντρολίβανο χρησιμοποιείται ευρύτατα διότι παρουσιάζει διάφορες ευεργετικές ιδιότητες όπως: αυξάνει, βραχυπρόθεσμα, τη λειτουργία του εγκεφάλου, της αναπνοής και την κυκλοφορία του αίματος, έχει σπασμολυτική δράση και μαλακώνει τους πόνους, διεγείρει τη λειτουργία και την έκκριση χολής, βελτιώνοντας έτσι την πέψη. Έχει επίσης τονωτική, αντισηπτική, αντιβακτηριδιακή και αντιρρευματική δράση. Είναι ευεργετικό στο δέρμα, ενώ τονώνει τη λειτουργία του ήπατος, βοηθά στη μείωση της χοληστερίνης και αναζωογονεί τον κουρασμένο οργανισμό. Τέλος, η συχνή χρήση του είναι ιδανική κατά της τριχόπτωσης και της πιτυρίδας.

Η σύσταση του και αυτή του αιθέριου ελαίου του έχουν μελετηθεί και περιγραφθεί. Συγκεκριμένα, περιέχει καρνοσόλη, καρνοσικό οξύ, καφεϊκό οξύ, ρουτίνη, κερκετίνη, καμπφερόλη, μυρισετίνη, χλωρογενικό οξύ, διτερπένια, ροσμανόλη, επιροσμανόλη, βορνεόλη, ροσμαδιόλη, α-πινένιο κ.α. (Etter, 2005, Gachkar *et al.*, 2007). Στα συστατικά αυτά αποδίδεται και η ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα που παρουσιάζει το συγκεκριμένο βότανο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συντηρητικό σε πολλά τρόφιμα (Gachkar *et al.*, 2007). Επίσης, παρουσιάζει αντιμικροβιακή ικανότητα, αφού το μεθανολικό εκχύλισμα του εν λόγω φυτού εμποδίζει την ανάπτυξη τερηδόνας από τα βακτήρια *S. mutans* και *S. Sanguinis*. Αυτό οφείλεται, πλην του αιθέριου ελαίου, στα φαινολικά συστατικά του και συγκεκριμένα στο χλωρογενικό οξύ, στο

καφεϊκό οξύ, στη ρουτίνη, στην κερκετίνη, στην καμπερόλη και στη μυρισετίνη (Tsai *et al*, 2008).

Τέλος, έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες για τον προσδιορισμό της ικανότητας του να αναστέλλει τον καρκίνο. Ο Ho και οι συνεργάτες του (2000) αναφέρουν ότι τα φαινολικά συστατικά του δενδρολίβανου μπορούν να επηρεάσουν τις φάσεις έναρξης και εξέλιξης όγκου.

Γ. Γένος *Satureja*

Satureja thymbra:

Ευρέως γνωστό με το όνομα Θρούμπα ή Θρούμπι ή Θρύμπα. Πρόκειται για πολυετές, ποώδες φυτό που φτάνει περίπου τα 40 εκατοστά. Έχει μονόκλαδο βλαστό, διακλαδωμένο στο πάνω μέρος του και φύλλα μικρά, γκρίζα, ίσια, λογχοειδή, με μικρό μίσχο, τα οποία το καλοκαίρι, περίοδος κατά την οποία εμφανίζονται τα μικρά λευκά άνθη του, γίνονται ελαφρώς πορφυρά (Εικόνα 1.20). Απαντάται κυρίως σε ορεινά μέρη. Παραδοσιακά έχει χρησιμοποιηθεί ως τονωτικό, αντιβακτηριακό, αντισηπτικό, στυπτικό, διουρητικό και αφροδισιακό. Η χρήση του, ως αφέψημα, ενδείκνυται για κρυολόγημα και βήχα, καθώς έχει αποχρεμπτικές ιδιότητες και επίσης είναι ευεργετικό για τους πόνους των μυών και για τη διάρροια. Η κατάχρηση του βοτάνου από έγκυες γυναίκες μπορεί να προκαλέσει αποβολή λόγω συσπάσεων της μήτρας. Τέλος, βελτιώνει την πέψη, αυξάνει την εφίδρωση και διεγείρει το νευρικό σύστημα.



Εικόνα 1.20 *Satureja thymbra*

Δεν είναι πολλές οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε αυτό το είδος του γένους *Satureja*. Τα τελευταία χρόνια βρέθηκε ότι τα φυτά αυτού του γένους έχει αντιμικροβιακές, αντιμυκητιασικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, αντιδιαβητικές, αντι-HIV κ.α. ιδιότητες (Sahin *et al.*, 2003, Vagionas *et al.*, 2007). Οι ιδιότητες του αυτές αποδίδονται κυρίως στα τερπενικά συστατικά του: καρβακρόλη, θυμόλη, β-καρυοφυλλένιο, γ-τερπινένιο, π-κυμένιο και λιναλοόλη.

Δ. Γένος *Thymus*

Thymus vulgaris:

Είναι ευρέως γνωστό με την κοινή ονομασία Θυμάρι. Απαντάται στις νότιες και Μεσογειακές περιοχές της Ευρώπης, σε διάφορες περιοχές της Ασίας ενώ καλλιεργείται στη βόρεια Αμερική. Στην Ελλάδα υπάρχουν 23 αυτοφυή είδη. Μορφολογικά, πρόκειται για ένα θάμνο πολύκλαδο, με χνουδωτό βλαστό με πολλά όρθια κλωνάρια που φτάνουν ύψος από 0,10-0,30 μέτρα. Τα φύλλα του είναι μικρά, σκληρά, στενά, ωοειδή και τα άνθη χαρακτηριστικά των Χειλιανθών με ροζ χρώμα (Εικόνα 1.21). Παραδοσιακά χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση της δυσπεψίας και άλλων γαστρεντερικών διαταραχών, του βήχα, της βρογχίτιδας, της λαρυγγίτιδας κ.α.. Επίσης, η τοπική εφαρμογή του ενδείκνυται για την ίαση τραυμάτων, διαταραχές της στοματικής κοιλότητας και για την στοματική υγιεινή. Τέλος, στην Ευρώπη θεωρείται ότι διαθέτει βρογχοσπασμολυτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες (Fecka & Turek, 2007).



Εικόνα 1.21 *Thymus vulgaris*

Η ανάλυση του θυμαριού και του αιθέριου ελαίου του έδειξε μεγάλες συγκεντρώσεις καρβακρόλης και θυμόλης, ενώ περιέχονται επίσης: καφεϊκό οξύ, ροσμαρινικό οξύ, απιγενίνη, λουτεολίνη, ναρουριτίνη, μονοτερπένια κ.α. (Takeuchi *et al.*, 2004). Οι αντισηπτικές, αντιβηχικές και αποχρεμπτικές του ιδιότητες αποδίδονται κυρίως στα μονοτερπένια που περιέχει (καρβακρόλη, θυμόλη). Επιπλέον, εμφανίζει μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα, όπως έχει προσδιοριστεί με DPPH και TBARS (Kulisic *et al.*, 2006). Έχει αναφερθεί, επίσης, ότι μπορεί να αναστείλει την οξειδωση των λιπών στα μιτοχόνδρια, *in vitro*, ενώ προκαλεί αναστολή της παραγωγής του υπεροξειδικού ανιόντος (Bruneton, 1999). Όσον αφορά τις αντικαρκινικές του ιδιότητες, πολλά από τα συστατικά που περιέχει, έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι παρουσιάζουν χημειοπροστατευτική δράση εναντίον διαφόρων μορφών καρκίνου (Craig, 1999).

Ε. Γένος *Sideritis*

Sideritis syriaca:

Το φυτό αυτό είναι το κοινό τσάι του βουνού. Το γένος *Sideritis* περιλαμβάνει 80 περίπου είδη, που φύονται στις παραμεσόγειες χώρες, τις Καναρίους νήσους και την Βόρειο Ασία. Στην Ελλάδα αυτοφύονται περίπου 17 είδη. Το συγκεκριμένο είναι ενδημικό της Κρήτης όπου και είναι γνωστό και ως μαλοτήρας ή καλοκοιμηθιά. Μορφολογικά, πρόκειται για ένα πολυετές αρωματικό φυτό, θαμνώδες, με λεπτούς και στρογγυλούς κλάδους, χνουδωτούς και σαρκώδη, ελλειψοειδή, χνουδωτά φύλλα. Η περίοδος ανθοφορίας του είναι στις αρχές του καλοκαιριού. Τα



Εικόνα 1.22 *Sideritis syriaca*

άνθη του είναι κίτρινα ή λευκά, μικρά, κατά σπονδύλους απομακρυσμένους ή πλησίον αλλήλων χωρίς βράκτια (Εικόνα 1.22). Ευδοκίμει σε υψόμετρο πάνω από 700 μέτρα και είναι πολύ ανθεκτικό στην ξηρασία. Παραδοσιακά, θεωρείται καταπραϋντικό για το πεπτικό και το αναπνευστικό. Το αφέψημα έχει αποχρεμπτικές, εφιδρωτικές και σπασμολυτικές ιδιότητες. Χρησιμοποιείται, επίσης, κατά της διάρροιας και της δυσπεψίας και είναι διουρητικό.

Δεν είναι πολλές οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί όσον αφορά τις ευεργετικές ιδιότητες του *Sideritis syriaca* για την υγεία. Έχει αναφερθεί ότι η παρουσία τερπενοειδών, αιθέριων ελαίων και φλαβονοειδών στα φυτά του είδους *Sideritis*, τους προσδίδει αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Πιο συγκεκριμένα, στο τσάι του βουνού έχουν ανιχνευθεί: χλωρογενικό οξύ, απιγενίνη, πρωτοκατεχικό οξύ. Εξαιτίας του φαινολικού περιεχομένου, το τσάι του βουνού μπορεί να δράσει ως αντιοξειδωτικό, έχοντας ευεργετικές συνέπειες στον οργανισμό (Armata *et al*, 2008).

ΣΤ. Γένος *Salvia*

Salvia officinalis:

Η κοινή του ονομασία είναι Φασκόμηλο. Μορφολογικά, είναι ένας μικρός ξυλώδης πολυετής θάμνος που φτάνει σε ύψος τα 70 εκατοστά. Τα φύλλα του είναι ωοειδή και γκριζοπράσινα με βελούδινη υφή και γεύση πικρή. Τα λουλούδια είναι μοβ-μπλε που ανθίζουν από τον Μάιο έως τον Ιούλιο. Συναντάται σε υγρές, άγριες, ακαλλιέργητες περιοχές σε πολλά μέρη στην Ελλάδα, κυρίως στα νότια τμήματά της (Εικόνα 1.23). Όσον αφορά τις παραδοσιακές του θεραπευτικές

ιδιότητες, η τοπική χρήση προσφέρει ανακούφιση σε τσιμπήματα εντόμων ή σε πληγές με πύο. Επίσης, γαργάρες με το αφέψημα καταπραΰνουν τον ερεθισμό των ούλων και του λαιμού, ενώ είναι τονωτικό για το δέρμα του προσώπου. Επιπρόσθετα, το συχνό λούσιμο με το αφέψημα είναι καλό για την τριχόπτωση. Χρησιμοποιείται επίσης στη μαγειρική, προσδίδοντας γεύση και άρωμα σε πολλά φαγητά. Τέλος, βοηθά στην ατονία του στομάχου, στην ελάττωση μνήμης, στο κρυολόγημα, και στην έντονη εφίδρωση.



Στα συστατικά που έχουν αναγνωριστεί στο εκχύλισμα του **Εικόνα 1.23** *Salvia officinalis* συμπεριλαμβάνονται: καρνοσόλη, καρνοσολικό οξύ, ροσμαρινικό οξύ, καφεϊκό οξύ, νεοχλωρογενικό οξύ, π-κουμαρικό οξύ, κερκετίνη, λουτεολίνη, απιγενίνη κ.α. (Lu & Foo, 2001). Χάρης στα συστατικά αυτά, το φασκόμηλο επιδεικνύει ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα (Thorsen & Hildenbrandt, 2003). Επιπλέον, η καρνοσόλη, ένα από τα συστατικά του φασκόμηλου που απαντά σε μεγάλες συγκεντρώσεις, έχει μελετηθεί αρκετά ως προς τις αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές της ιδιότητες. Από πολλές μελέτες έχει βρεθεί ότι μπορεί να αναστείλει ένζυμα που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της φλεγμονής (5-LOX, COX-2, NOS κ.α.) επηρεάζοντας ποικίλα σηματοδοτικά μονοπάτια (Johnson, 2011). Η αντικαρκινική της δράση έχει μελετηθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου (π.χ. του προστάτη, του στήθους, του δέρματος, της λευχαιμίας κ.α.) με ενθαρρυντικά αποτελέσματα. (Johnson, 2011).

Z. Γένος *Mentha*

Mentha pulegium:

Η κοινή του ονομασία είναι Φλισκούνη. Είναι ποώδες πολυετές φυτό που φτάνει μέχρι 50 εκατοστά. Έχει βλαστό όρθιο ή πλαγιαστό και αρκετά διακλαδιζόμενο. Τα φύλλα του είναι μικρά, ελλειπτικά και ολόκληρο το φυτό είναι σκεπασμένο με σταχτοπράσινο χνούδι. Τα άνθη του είναι μοβ και εντοπίζονται στην κορυφή των βλαστών, ενώ η περίοδος ανθοφορίας του είναι περίπου από τον Ιούνιο μέχρι τον Σεπτέμβριο (Εικόνα 1.24). Πρόκειται για αυτοφυές φυτό κυρίως σε υγρά μέρη, σε όχθες ποταμών και ρυακιών. Γενικά, θεωρείται καρδιοτονωτικό, σπασμολυτικό, κατά των νευρικών διαταραχών, κατά της ημικρανίας και κατά των ιλίγγων.



Εικόνα 1.24 *Mentha pulegium*

Εκχυλίσματα και ροφήματα από το φυτό αυτό έχουν βρεθεί ότι είναι ευεργετικά για το αναπνευστικό, το γαστρεντερικό και το ουρογεννητικό σύστημα. Επιπλέον, πολλοί ερευνητές έχουν ισχυριστεί ότι διαθέτει καθαρτικές, διουρητικές, αντισηπτικές, χωνευτικές, εμμηνορραγικές και διεγερτικές ιδιότητες (Camejo *et al.*, 2003, Novais *et al.*, 2004, Carvalho, 2005). Σε μία πρόσφατη μελέτη βρέθηκε ότι επιδεικνύει αντιοξειδωτική ικανότητα (Guimaraes *et al.*, 2011), ωστόσο το περιεχόμενό του σε φυτοχημικά δεν έχει ακόμα πλήρως προσδιοριστεί.

Βότανα της οικογένειας Clusiaceae

Γένος *Hypericum*

Hypericum perforatum:

Το βότανα αυτό είναι γνωστό ως Υπερικό ή Σπαθόχορτο. Μορφολογικά, είναι λείο, ολοετές και συνήθως ξυλώδες στη βάση με το ύψος του να φτάνει τα 50 εκατοστά. Τα φύλλα του είναι ωοειδή προς γραμμικά, άμισχα, αντίθετα κατανεμημένα και έχουν ημιδιαφανείς λείες κηλίδες. Η περίοδος ανθοφορίας του εντοπίζεται από τον Ιούνιο έως το Σεπτέμβριο, και τα άνθη του έχουν κίτρινο χρώμα (Εικόνα 1.25) (Hobbs, 1998). Φυτρώνει κυρίως σε χωράφια, λιβάδια και πλαγιές βουνών. Η φαρμακευτική του χρήση



Εικόνα 1.25 *Hypericum perforatum*

χρονολογείται από τον πέμπτο αιώνα π.Χ. όταν εφαρμοζόταν τοπικά για την ίαση τραυμάτων. Τον προηγούμενο αιώνα ο Duke (1985) ανέφερε τη χρήση του για τη θεραπεία διαφόρων τύπου καρκίνου καθώς και άλλες ιδιότητες του ροφήματός του όπως η αντιμετώπιση: της διάρροιας, της δυσεντερίας, της νευρασθένειας κ.α.. Έχουν αναφερθεί, επίσης, αποχρεμπτικές, αντιπυρετικές, αντισηπτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές και στυπτικές ιδιότητες. Αλοιφές που περιέχουν Σπαθόχορτο βοηθούν σε περιπτώσεις πληγών και εγκαυμάτων. Είναι ιδανικό για αϋπνίες, πονοκεφάλους και νεύρα. Επίσης είναι χωνευτικό και διουρητικό.

Όσον αφορά τη σύστασή του, πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί αποκαλύπτοντας μεγάλο μέρος των φυτοχημικών που περιέχει. Κάποια από αυτά είναι: υπερικίνη, καμπερόλη, λουτεολίνη, κερκετίνη, π- κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, γλωρογενικά οξέα, α-πινένιο, β-πινένιο, β-καρυοφυλλένιο, γερανιόλη, βιταμίνη C κ.α. (Saddiqe *et al.*, 2010). Σε αυτά τα συστατικά αποδίδονται και η πληθώρα ευεργετικών δράσεων στην υγεία.

Γένος *Marticaria*

Marticaria chamomilla:

Είναι το κοινό χαμομήλι. Πρόκειται για μονοετές, ποώδες φυτό που φτάνει τα 35 εκατοστά και αυτοφύεται σε χέρσα και καλλιεργημένα μέρη σε όλη την Ελλάδα. Έχει λείο βλαστό, πολύκλαδο και όρθιο. Τα φύλλα είναι πτεροσχιδή και τα άνθη είναι λευκά-κίτρινα (Εικόνα 1.26). Η περίοδος ανθοφορίας είναι περίπου στα μέσα της Άνοιξης. Ένα φλιτζάνι χαμομηλιού βοηθά στον ύπνο, ηρεμεί τους πονοκεφάλους και καταπραΰνει τους πόνους των δοντιών. Επίσης, ένα φλιτζάνι πριν το γεύμα ανοίγει την όρεξη, ενώ μετά από αυτό βοηθά στη χώνεψη. Οι κομπρέσες κάνουν καλό σε πληγές και εγκαύματα. Επιπλέον, κάνει καλό στο πρόσωπο ειδικά γύρω από τους οφθαλμούς και τις φλεγμονές των βλεφάρων. Το εκχύλισμα χαμομηλιού δίνει ζωηρές ανταύγειες στα ξανθά μαλλιά. Τέλος, έχει αντιπυρετική, σπασμολυτική, ανθελμινθική, διουρητική και αντιαλλεργική δράση.



Εικόνα 1.26 *Marticaria chamomilla*

Τα άνθη του χαμομηλιού περιέχουν πτητικές ουσίες χαμαζουλίνη, φαρνεσίνη, φυτικές χρωστικές (ρουτίνη, κουερσιμετρίνη) κουμαρίνες (ουμπελιφερόνη), φυτικά οξέα (μεταξύ των οποίων βαλεριανικό οξύ), λιπαρά οξέα, σαλικυλικά παράγωγα, πολυσακχαρίτες, χολίνη, αμινοξέα, ταννίνες στις οποίες αποδίδονται και οι δράσεις του στην υγεία. Έχει βρεθεί ότι το συνολικό φαινολικό περιεχόμενό του είναι $106 \pm 0,37$ mg GAE/240 ml (Atoui *et al*, 2005). Τέλος, το υδατικό εκχύλισμα χαμομηλιού αποδείχτηκε, *in vitro*, να παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση έναντι του *Helicobacter pylori*, ενός κατά Gram-αρνητικού βακτηριδίου που προσβάλλει το στομάχι και μάλιστα ενισχύει τις πιθανότητες καρκίνου του στομάχου (Stamatis *et al*, 2003).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1 Φυτά

Μελετήθηκαν δώδεκα είδη βοτάνων της Ελληνικής χλωρίδας (Πίνακας 2.1). Τα βότανα ήταν τυποποιημένα σε συσκευασίες των 250g και προέρχονταν από τη Νύβριτο Ηρακλείου Κρήτης, πλην του Σπαθόχορτου το οποίο ήταν τυποποιημένο από τον Σύλλογο Γυναικών Άνω Πορρόιας του Νομού Σερρών.

Πίνακας 2.1 Φυτά

	Κοινή ονομασία	Επιστημονική ονομασία (Γένος, Είδος)	Οικογένεια
1	Αντωνιάδα	<i>Origanum microphyllum</i>	Lamiaceae
2	Δενδρολίβανο	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Lamiaceae
3	Δίκταμο	<i>Origanum dictamnus</i>	Lamiaceae
4	Θρύμπα	<i>Satureja thymbra</i>	Lamiaceae
5	Θυμάρι	<i>Thymus vulgaris</i>	Lamiaceae
6	Μαντζουράνα	<i>Origanum majorana</i>	Lamiaceae
7	Ρίγανη	<i>Origanum vulgare</i>	Lamiaceae
8	Σπαθόχορτο	<i>Hypericum perforatum</i>	Clusiaceae
10	Τσάι Βουνού	<i>Sideritis syriaca</i>	Lamiaceae
10	Φασκόμηλο	<i>Salvia officinalis</i>	Lamiaceae
11	Φλισκούνι	<i>Mentha pulegium</i>	Lamiaceae
12	Χαμομήλι	<i>Marticaria chamomilla</i>	Asteraceae

2.2 Διαδικασία παραλαβής αφυδατωμένου αφεψήματος

Διαλύτες-Όργανα

Καταψύκτης (-40°C)

Αναλυτικός ζυγός ακρίβειας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων

Συσκευή λυοφιλίωσης

Ογκομετρικός κύλινδρος 250mL

Ποτήρια ζέσεως 100mL

Γυάλινο σκεύος βρασμού

Εστία βρασμού

Μεταλλικό νερό

Διηθητικό χαρτί

Γυάλινο χωνί

Parafilm

Φιαλίδια με βιδωτό πώμα καλυμμένο με Teflon, όγκου 10mL

Αναλυτική Πορεία

Η διαδικασία παρασκευής και αφυδάτωσης των αφεψημάτων ήταν παρόμοια για όλα τα είδη βοτάνων. Αρχικά, ζυγίζονται 3g βοτάνου σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών. Με ογκομετρικό κύλινδρο λαμβάνονται 250mL εμφιαλωμένου νερού (Ζαγόρι). Στη συνέχεια, η προζυγισμένη ποσότητα δείγματος και τα 250mL νερού μεταφέρονται σε γυάλινο σκεύος βρασμού από βοριοπυριτικό γυαλί (pyrex), το οποίο τοποθετείται σε προθερμασμένη εστία. Το σκεύος απομακρύνεται από την εστία 3min μετά την έναρξη βρασμού και το αφέψημα αφήνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 2min και στη συνέχεια διηθείται. Σε περίπτωση που ο όγκος του αφεψήματος είναι μικρότερος από 200mL, συμπληρώνεται με κατάλληλο όγκο νερού. Το αφέψημα, στη συνέχεια, μεταφέρεται σε ποτήρια ζέσεως γνωστού όγκου, τα οποία καλύπτονται με παραφίλμ και ψύχεται για 24h στους -40°C. Τα ροφήματα αφυδατώνονται με λυοφιλίωση επί 72h. Για την έκφραση των αποτελεσμάτων διορθωμένων ως προς τα διαλυμένα άλατα του εμφιαλωμένου νερού, έγινε λυοφιλίωση ίσου όγκου νερού εις τριπλούν.

Η διαδικασία ολοκληρώνεται με παραλαβή του στερεού υπολείμματος, το οποίο αφού ζυγισθεί, τοποθετείται σε γυάλινα φιαλίδια με βιδωτό πώμα. Αποθηκεύονται σε θάλαμο βαθιάς ψύξης (-40°C) υπό συνθήκες σκότους.

2.3 Προσδιορισμός πολυφαινολών

2.3.1 Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου με την μέθοδο Folin-Ciocalteu

Αντιδραστήρια-Όργανα

Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (FC, 2N)

Κορεσμένο διάλυμα Na₂CO₃ (20% w/v)

MeOH αναλυτικής καθαρότητας

Απιονισμένο νερό

Αναδευτήρας Vortex

Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών

Φιαλίδια erpendorf, χωρητικότητας 1,5mL

Αυτόματες πιπέττες (10-1000μL), tips

Κυψελίδες

Γαλλικό οξύ (Gallic acid, GA)

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται σε οξειδοαναγωγική αντίδραση με την οποία προσδιορίζεται το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο χωρίς διάκριση μεταξύ μονομερών, διμερών και πολυμερών φαινολικών συστατικών. Το FC είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Οξειδώνει τα φαινολικά ιόντα με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση, της οποίας δεν είναι γνωστή η στοιχειομετρία:



Το προϊόν είναι σύμπλοκο μολυβδαινίου-βολφραμίου (Mo-W) χαρακτηριστικής μπλε χρώσης που απορροφά στο ορατό (750nm). Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3 (20% w/v) που αφενός δε διαταράσσει την σταθερότητα του FC και του προϊόντος της αντίδρασης, αφετέρου αποτελεί προϋπόθεση παρουσίας των φαινολικών ιόντων.

Αναλυτική Πορεία

Σε ένα φιαλίδιο erpendorf τοποθετούνται 790μL απιονισμένου νερού και έπειτα 10μL δείγματος αφυδατωμένου ροφήματος, αναδιαλυμένου σε μεθανόλη, συγκέντρωσης 4mg/mL ή καθαρής μεθανόλης για την παρασκευή του τυφλού δείγματος. Στη συνέχεια, προστίθενται 50μL αντιδραστήριου FC. Ακολουθεί ανάδευση, ενώ μετά το πέρας 1min προστίθενται επίσης 150μL κορεσμένου διαλύματος Na_2CO_3 (20% w/v). Το μίγμα ανακινείται εκ νέου και φυλάσσεται σε σκοτεινό μέρος, για 120min, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το προϊόν της αντίδρασης φωτομετρείται στα 750nm ως προς το λευκό δείγμα, ενώ κατασκευάζεται και πρότυπη καμπύλη αναφοράς με γαλλικό οξύ. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος.

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Παρασκευάζονται διαλύματα γαλλικού οξέος (GA) συγκεντρώσεων 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800mg/L. Ακολουθεί η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος $\psi=f(x)$, όπου x η ποσότητα του GA σε mg/L και ψ η απορρόφηση στα 750nm.

2.3.2 Προσδιορισμός των ολικών φλαβονολών

Αντιδραστήρια-Όργανα

AlCl_3 (2% σε 5% CH_3COOH σε MeOH)

CH_3COOH (5% σε MeOH)

MeOH αναλυτικής καθαρότητας

Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης

Αυτόματες πιπέττες (10-1000 μL), tips

Φιαλίδια erppendorf, χωρητικότητας 1,5mL

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων

Ογκομετρικές φιάλες όγκου 250 mL

Ρουτίνη

Αναλυτική Πορεία

Σε ένα φιαλίδιο erppendorf προστίθενται 50 μL AlCl_3 , 500 μL διαλύματος αφυδατωμένου ροφήματος –αναδιαλυμένου σε μεθανόλη, συγκέντρωσης 2mg/mL και 500 μL CH_3COOH . Το μίγμα αφήνεται για 30min σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια μετράται η απορρόφηση στα 415nm. Η συγκέντρωση των φλαβονών στο δείγμα υπολογίζεται με τη χρήση καμπύλης αναφοράς ρουτίνης και εκφράζεται ως ισοδύναμα ρουτίνης.

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Παρασκευάζονται διαλύματα ρουτίνης συγκεντρώσεων 1, 5, 2, 4, 6, 8, 10 $\mu\text{g/ml}$. Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος $\psi=f(x)$, όπου x η ποσότητα της ρουτίνης σε $\mu\text{g/ml}$ και ψ η απορρόφηση στα 415nm.

2.4 Αντιοξειδωτικές δοκιμές

2.4.1 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιζόμενη στη δέσμευση της 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλο-υδράζυλο ελεύθερης ρίζας ($\text{DPPH}\cdot$)

Αντιδραστήρια-Όργανα

Διάλυμα $\text{DPPH}\cdot$ σε MeOH (3,9mg σε 100 mL)

MeOH

Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης

Λουτρό υπερήχων

Αναδευτήρας Vortex

Φιαλίδια erpendorf, χωρητικότητας 1,5mL

Κυψελίδες χαλαζία

Αυτόματες πιπέττες (10-1000μL), tips

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών ουσιών να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH[•]. Η δέσμευση αυτής της σταθερής ελεύθερης ρίζας έχει ως αποτέλεσμα το διάλυμα να αποχρωματίζεται. Η ελάττωση της απορρόφησης μετράται στα 515nm.

Αναλυτική Πορεία

Σε φιαλίδια erpendorf προστίθενται 25 μL δείγματος –αφυδατωμένου ροφήματος, αναδιαλυμένου σε μεθανόλη, συγκέντρωσης 2mg/mL ή μεθανόλης για το λευκό προσδιορισμό και 975μL DPPH[•]. Ακολουθεί ανάδευση και αφήνονται σε σκοτεινό μέρος για 30min. Η απορρόφηση μετράται σε t=0min και t=30min στα 515nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα Trolox (ανάλογο της βιταμίνης E) μέσω της πρότυπης καμπύλης.

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Παρασκευάζονται διαλύματα Trolox συγκεντρώσεων 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1,2, 1,4, 1,6mM. Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος $\psi=f(x)$, όπου x η ποσότητα του Trolox σε mM και ψ η %ΔA₅₁₅, όπου $\% \Delta A_{515} = [(A^0_{515} - A^{30}_{515}) / A^0_{515}] \times 100$

2.4.2. Προσδιορισμός αναγωγικής ικανότητας μέσω αναγωγής του Fe^{+3} σε Fe^{+2} (FRAP)

Αντιδραστήρια-Όργανα

FeCl₃, (3 mM σε 5 mM HCl)]

TPTZ [(2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine), (2, 4, 6-τριπυριδυλο-s-τριαζίνη)] 1mM σε 0,05M HCl

Απιονισμένο νερό

Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης

Υδατόλουτρο

Αναδευτήρας Vortex

Αυτόματες πιπέττες (100-1000μL), tips

Φιαλίδια erpendorf, χωρητικότητας 1,5mL

Κυψελίδες χαλαζία

Αρχή μεθόδου

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

Αναλυτική Πορεία

Σε ένα φιαλίδιο eppendorf αναμιγνύονται 50μl διαλύματος αφυδατωμένου ροφήματος αναδιαλυμένου σε μεθανόλη, κατάλληλα αραιωμένου, με 50μL FeCl₃ (3mM σε 5mM HCl) ή 50μL απιονισμένο νερό για τη παρασκευή του λευκού δείγματος. Στον Πίνακα 2.2 φαίνονται οι αραιώσεις που έγιναν για κάθε δείγμα. Ακολουθεί καλή ανάδευση και το μίγμα αφήνεται να αντιδράσει για 30min σε υδατόλουτρο στους 37°C. Στη συνέχεια, προστίθενται 900μL διαλύματος TPTZ και ακολουθεί ανάδευση. Ο Fe⁺² που έχει προκύψει δημιουργεί έγχρωμο (μπλε) σύμπλοκο με το TPTZ. Το δείγμα παραμένει για 10min στο σκοτάδι και ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 620nm. Παράλληλα κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς βιταμίνης C (η βιταμίνη C ανάγει το Fe³⁺ σε Fe²⁺) και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα ασκορβικού οξέος.

Πίνακας 2.2 Τελικές αραιώσεις αφεψημάτων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αντίδραση FRAP

Δείγμα	αρχική συγκέντρωση (mg/mL)	αραίωση (v/v)
Αντωνάϊδα	2	1:2
Δεντρολίβανο	2	1:2
Δίκταμο	2	1:4
Θρύμπα	2	1:2
Θυμάρι	2	1:2
Μαντζουράνα	2	1:2
Ρίγανη	2	1:4
Σπαθόχορτο	2	1:4
Τσάι Βουνού	2	1:2
Φασκόμηλο	2	1:2
Φλισκούνη	2	1:2
Χαμομήλι	2	1:2

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Παρασκευάζονται διαλύματα ασκορβικού οξέος συγκεντρώσεων 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5mM. Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος $\psi=f(x)$, όπου x η ποσότητα του ασκορβικού οξέος σε mM και ψ η απορρόφηση στα 620nm.

2.5 Κυτταρικές σειρές

2.5.1 Κυτταρικές σειρές HT29 και PC3

HT29

Πρόκειται για επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου, απομονωμένα από όγκο σε κόλον Καυκάσιας γυναίκας 44 ετών το 1964.

PC3

Πρόκειται για επιθηλιακά κύτταρα του προστάτη, απομονωμένα από όγκο του προστάτη Καυκάσιου άνδρα 62 ετών.

2.5.2 Καλλιέργεια κυττάρων

Τα αντιδραστήρια, τα όργανα και η πορεία που ακολουθήθηκε ήταν κοινή για τις δυο κυτταρικές σειρές.

Αντιδραστήρια-Όργανα

Καλλιεργητικό υλικό DMEM

Βόειος ορός

Πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη

Διάλυμα χρωστικής κυανούν του τρυπανίου (trypan blue)

Αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα PBS 20mM, pH 7.4

Διάλυμα θρυψίνης-EDTA

Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)

Δοκιμαστικοί σωλήνες των 15 ή 50mL αποστειρωμένοι (sterilized falcon tubes)

Αποστειρωμένα πλαστικά σιφώνια των 5 ή 10mL

Tips αποστειρωμένα

Φλάσκες καλλιεργητικές

Αποστειρωμένα κρυογονικά φιαλίδια των 2mL
Επωαστικός θάλαμος διοξειδίου (συνθήκες: 37°C, 5% CO₂)
Ψυγεία, Καταψύκτης (-20°C), Υπερκατάψυξη (-80°C), Υγρό άζωτο (-196°C)
Ερευνητικό μικροσκόπιο φθορισμού με camera και monitor
Αυτόματες πιπέττες (200-1000μL)
Θάλαμος διπλής κάθετης νηματικής ροής (LAMINAR FLOW) με λάμπες UV

Αναλυτική Πορεία

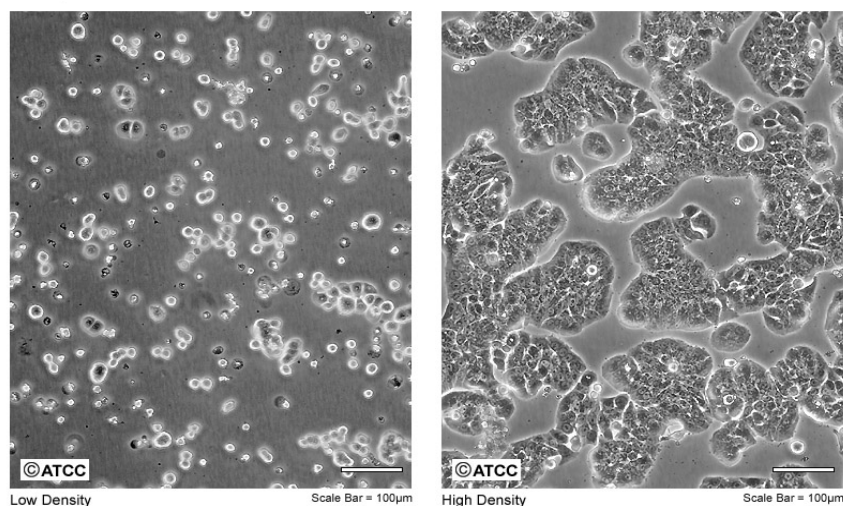
Μέτρηση των κυττάρων και έλεγχος βιωσιμότητας

Η μέτρηση των κυττάρων γίνεται με αιμοκυττόμετρο. Στο κυτταρικό αιώρημα προστίθεται κατάλληλος όγκος χρωστικής trypan blue. Ακολουθεί επώαση για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα τοποθετούνται στο αιμοκυττόμετρο και μετρώνται. Από τον αριθμό των κυττάρων που έχουν βαφεί κυανά λόγω εισόδου της χρωστικής, υπολογίζεται το ποσοστό βιωσιμότητας σύμφωνα με τη σχέση:

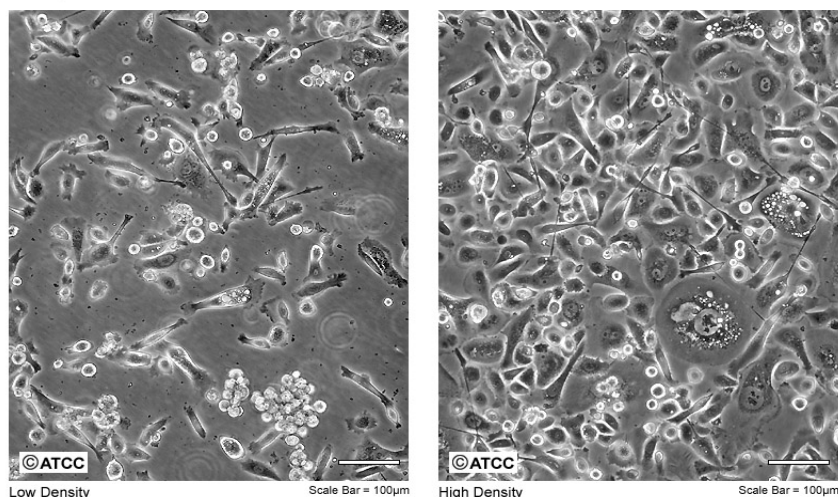
$$\text{«\% Ποσοστό βιώσιμων} = 100 \times \text{νεκρά κύτταρα (κυανά) / συνολικά μετρηθέντα κύτταρα} \text{»}$$

Καλλιέργεια κυττάρων

Τα κύτταρα διατηρούνται σε θρεπτικό υλικό που αποτελείται από καλλιεργητικό υλικό DMEM με προσθήκη 10% FBS, 100U/mL πενικιλίνης και 100μg/mL στρεπτομυκίνης σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ 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 σε ποσοστό περίπου 80% (Εικόνες 2.1, 2.2). Ο χρόνος διπλασιασμού είναι 48h. Για τη μέτρηση των κυττάρων, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από τη φλάσκα. Ακολουθεί πλύση με PBS (5mL) και επίδραση με διάλυμα θρυψίνης-EDTA (2-3mL) παρατηρώντας στο μικροσκόπιο μέχρι να αποκολληθεί η στιβάδα από τη φλάσκα (συνήθως μεταξύ 5 και 15 min). Στη συνέχεια, τα κύτταρα μεταφέρονται σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει θρεπτικό υλικό (15-20mL) και φυγοκεντρούνται για 5min σε 1800rpm στους 20°C, ώστε να απομακρυνθεί το διάλυμα θρυψίνης-EDTA. Τα κύτταρα, ακολούθως, πλένονται ξανά. Ο διαχωρισμός των κυττάρων σε φλάσκες είναι 1/3-1/8 για τα HT29 και 1/3-1/6 για τα PC3.



Εικόνα 2.1 Καλλιέργεια επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου HT29. Αριστερά: χαμηλή πυκνότητα. Δεξιά: υψηλή πυκνότητα. Κλίμακα 100µm.



Εικόνα 2.2 Καλλιέργεια επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων προστάτη PC3. Αριστερά: χαμηλή πυκνότητα. Δεξιά: υψηλή πυκνότητα. Κλίμακα 100µm.

Ψύξη και απόψυξη των κυττάρων

Καλλιέργεια των κυττάρων σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης φυγοκεντρείται σε 1800rpm για 5min στους 20°C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε διάλυμα ψύξης που αποτελείται από θρεπτικό υλικό με 20% FBS και 10% DMSO. Η πυκνότητα των κυττάρων ρυθμίζεται στα 5×10^6 κύτταρα/mL. Από το κυτταρικό αιώρημα φέρεται 1mL σε κρυογονικά φιαλίδια των 2mL, τα οποία καταψύχονται σταδιακά μέχρι να μεταφερθούν τελικά σε δοχείο υγρού αζώτου (-196°C). Η απόψυξη των κυττάρων γίνεται φέροντας το κρυογονικό φιαλίδιο, από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο στους 37°C. Μόλις το περιεχόμενο υγροποιηθεί, αραιώνεται περίπου δέκα φορές με θρεπτικό υλικό (37°C) και φυγοκεντρείται για 5min σε

1800rpm στους 20°C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και τα κύτταρα πλένονται άλλη μία φορά. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 5mL θρεπτικού υλικού, φέρεται σε φλάσκες καλλιέργειας και τοποθετείται στον επωαστικό θάλαμο (37°C, 95% υγρασία, 5% CO₂).

2.6 Μέθοδοι εκτίμησης βιολογικής δράσης αφεψημάτων

2.6.1 Διαλυτοποίηση στερεού υπολείμματος αφεψημάτων

Αντιδραστήρια-Όργανα

Καλλιεργητικό υλικό DMEM

Αυτόματες πιπέττες (100-1000μL), tips

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών

Πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες (10mL)

Αποστειρωμένα φιαλίδια erpendorf, χωρητικότητας 1,5mL

Αποστειρωμένα φίλτρακια (0.20μm)

Αποστειρωμένες σύριγγες (5mL)

Θάλαμος διπλής κάθετης νηματικής ροής (LAMINAR FLOW) με λάμπες UV

Καταψύκτης (-20°C)

Αναλυτική Πορεία

Η πορεία είναι κοινή και για τα δώδεκα βότανα. Αρχικά, ζυγίζεται επαρκής ποσότητα λυοφιλιωμένου ροφήματος σε πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα και προστίθεται κατάλληλος όγκος καλλιεργητικού υλικού DMEM, ώστε η συγκέντρωση του διαλύματος να είναι 200μg/μL. Το διάλυμα αποστειρώνεται περνώντας από αποστειρωμένο ηθμό μεμβράνης 0,20μm με τη βοήθεια σύριγγας. Αποθηκεύονται στους -20°C.

2.6.2 Έλεγχος του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη μέθοδο MTT

Επίδραση των κυττάρων με διαλύματα αφεψημάτων

Αντιδραστήρια-Όργανα

Πολυστυρενικά τρυβλία επώασης των 96 βοθρίων

Καλλιεργητικό υλικό DMEM

Βόειος ορός

Πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη

Αυτόματες πιπέττες (2-1000μL), tips

Θάλαμος διπλής κάθετης νηματικής ροής (LAMINAR FLOW) με λάμπες UV

Αναλυτική Πορεία

Με την πορεία που περιγράφηκε στην υποενότητα 2.5.2 τα κύτταρα μετρώνται και μοιράζονται ανάλογα με το πλάνο του πειράματος σε εξειδικευμένα πολυστυρενικά τρυβλία των 96 βοθρίων (7×10^3 κύτταρα/βοθρίο για τα HT29 και 5×10^3 /βοθρίο για τα PC3). Σε κάθε βοθρίο προστίθεται θρεπτικό υλικό μέχρι τελικού όγκου 200μL και τα κύτταρα επωάζονται (37°C, 95% υγρασία, 5% CO₂) για 24h, δηλαδή έως ότου προσκολληθούν στην επιφάνεια των βοθρίων. Μετά το πέρας των 24h γίνεται επίδραση με τα διαλύματα των αφυδατωμένων ροφημάτων των βοτάνων, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (200, 120, 40μg/μL), για 24, 48 και 72h.

Αντιδραστήρια-Όργανα

Διάλυμα MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) συγκέντρωσης 5mg/mL

Διάλυμα DMSO

Αυτόματες πιπέττες (20-1000μL), tips

Φωτόμετρο ELISA (ELISA reader)

Επωαστικός θάλαμος (συνθήκες: 37°C, 5% CO₂)

Θάλαμος διπλής κάθετης νηματικής ροής (LAMINAR FLOW) με λάμπες UV

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα του ενζύμου αφυδρογονάση των μιτοχονδρίων των ζώντων μόνο κυττάρων να διασπούν τους δακτυλίους τετραζολίου της κίτρινης χρωστικής MTT με αποτέλεσμα το σχηματισμό πορφυρών κρυστάλλων. Οι κρύσταλλοι αυτοί έχουν την ικανότητα να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες και να συσσωρεύονται στον ενδοκυττάριο χώρο των ζωντανών κυττάρων. Με την προσθήκη DMSO οι κρύσταλλοι απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο και ο αριθμός τους είναι ανάλογος του αριθμού των ζωντανών κυττάρων.

Αναλυτική Πορεία

Για τη μελέτη της επίδρασης των αφεψημάτων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό πραγματοποιείται χρωματομετρική φωτομετρική μέθοδος με τη χρωστική MTT. Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα MTT συγκέντρωσης 5mg/mL σε PBS. Στα κύτταρα που έχουμε

επιδράσει με τα διαλύματα των στερεών διαλυμάτων των βοτάνων (όπως περιγράφηκε παραπάνω) προστίθενται 20μL MTT. Επωάζουμε για 4h σε επωαστικό κλίβανο (συνθήκες: 37°C, 5% CO₂). Στη συνέχεια απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 200μL DMSO. Με την αυτόματη πιπέττα διαλυτοποιούμε τους κρυστάλλους κι επωάζουμε για άλλα 5min. Τέλος, μετρούμε την οπτική πυκνότητα σε ELISA φωτόμετρο στα 550nm.

2.6.3 Μέτρηση των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH)

Επίδραση των κυττάρων με διαλύματα αφεψημάτων

Αντιδραστήρια-Όργανα

Φλάσκες καλλιεργητικές

Δοκιμαστικοί σωλήνες των 15 ή 50mL αποστειρωμένα (sterilized falcon tubes)

Καλλιεργητικό υλικό DMEM

Βόειος ορός

Πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη

Αυτόματες πιπέττες (100-1000μL), tips

Θάλαμος διπλής κάθετης νηματικής ροής (LAMINAR FLOW) με λάμπες UV

Αναλυτική Πορεία

Με την πορεία που περιγράφηκε στην υποενότητα 2.5.2 τα κύτταρα μετρώνται και μοιράζονται ανάλογα με το πλάνο του πειράματος σε καλλιεργητικές φλάσκες ($2,5 \times 10^6$ κύτταρα ανά φλάσκα για τα HT29 και τα PC3). Σε κάθε φλάσκα προστίθεται θρεπτικό υλικό μέχρι τελικού όγκου 15mL και τα κύτταρα επωάζονται (37°C, 95% υγρασία, 5% CO₂) για 24h, δηλαδή έως ότου προσκολληθούν στην επιφάνεια των φλασκών. Μετά το πέρας των 24h προστίθενται 100μL από τα διαλύματα των στερεών υπολειμμάτων των βοτάνων, συγκέντρωσης 200μg/μL. Τα κύτταρα συλλέγονται μετά από 24h.

Αντιδραστήρια-Όργανα

Διάλυμα μεταφωσφορικού οξέος 5%

Δοκιμαστικοί σωλήνες των 15 ή 50mL αποστειρωμένα (sterilized falcon tubes)

Φωτόμετρο ELISA (ELISA reader)

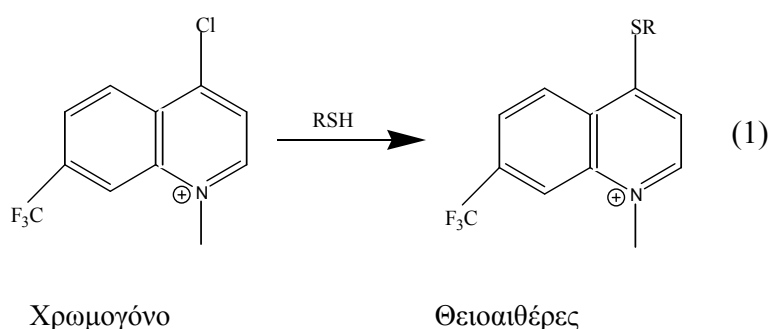
Αυτόματη πιπέττα (100μL), tips

Πολυστυρενικά τρυβλία 96 βοθρίων

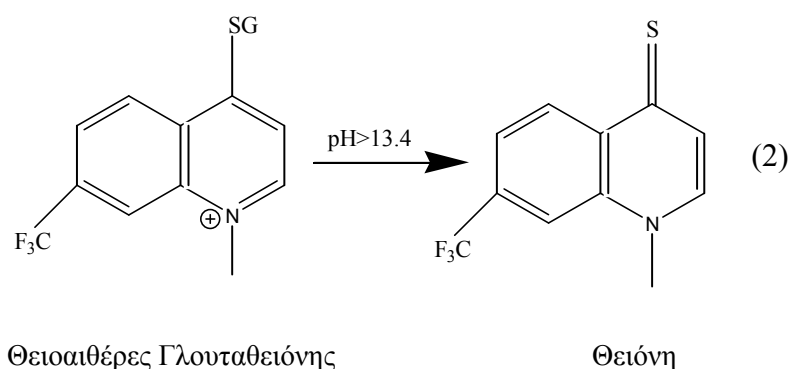
Εξειδικευμένο kit για τη μέτρηση της GSH

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στο σχηματισμό έγχρωμης ένωσης θειόνης η οποία απορροφά στα 400nm και η συγκέντρωση της είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της γλουταθειόνης. Αρχικά, προστίθεται η έγχρωμη ένωση 4-chloro-1-methyl-7-trifluoromethylquinolinium methylsulfate, που σχηματίζει θειοαιθέρες με όλες τις θειόλες που είναι παρούσες στο δείγμα σύμφωνα με την αντίδραση (1).



Με την προσθήκη βάσης για την αύξηση του pH πάνω από 13, οι θειοαιθέρες της γλουταθειόνης μετατρέπονται προς τη θειόνη σύμφωνα με την αντίδραση (2).



Αναλυτική Πορεία

Για τη μέτρηση των ενδοκυττάριων επιπέδων της GSH τα κύτταρα εκχυλίζονται με μεταφωσφορικό οξύ (2,5mL) και προσδιορίζεται η GSH στο εκχύλισμα με την εφαρμογή εξειδικευμένου Kit σε φωτόμετρο και τη χρήση καμπύλης αναφοράς με πρότυπη GSH, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρείας. Συγκεκριμένα, προστίθενται

100μL δείγματος ή standard διαλύματος σε εξειδικευμένα πολυστυρενικά τρυβλία των 96 βοθρίων. Στη συνέχεια προστίθενται 50μL χρωμογόνου και 50μL βασικού διαλύματος. Επωάζουμε για 30min σε θερμοκρασία δωματίου και στο σκοτάδι και μετράμε στα 400nm. Για την έκφραση των αποτελεσμάτων κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς όπως περιγράφεται ακολούθως.

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Μητρικό διάλυμα GSH 150μM και 175μM χρησιμοποιείται για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης. Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος $\psi=f(x)$, όπου x η συγκέντρωση της GSH σε μM και ψ η απορρόφηση στα 400nm.

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

Επίδραση των κυττάρων με διαλύματα αφεψημάτων

Αντιδραστήρια-Όργανα

Πολυστυρενικά τρυβλία επώασης των 12 βοθρίων

Καλλιιεργητικό υλικό DMEM

Βόειος ορός

Πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη

Αυτόματες πιπέττες (10-1000μL), tips

Θάλαμος διπλής κάθετης νηματικής ροής (LAMINAR FLOW) με λάμπες UV

Αναλυτική Πορεία

Με την πορεία που περιγράφηκε στην υποενότητα 2.5.2 τα κύτταρα μετρώνται και μοιράζονται ανάλογα με το πλάνο του πειράματος σε εξειδικευμένα πολυστυρενικά τρυβλία των 12 βοθρίων (10^5 κύτταρα ανά βοθρίο για τα HT29 και για τα PC3). Σε κάθε βοθρίο προστίθεται θρεπτικό υλικό μέχρι τελικού όγκου 4mL και τα κύτταρα επωάζονται (37°C , 95% υγρασία, 5% CO_2) για 24h, δηλαδή έως ότου προσκολληθούν στην επιφάνεια των βοθρίων. Μετά το πέρας των 24h προστίθενται 4μL από τα διαλύματα των αφυδατωμένων ροφημάτων των βοτάνων, συγκέντρωσης 200μg/μL. Η επώαση των κυττάρων μετά από την επίδραση με τα διαλύματα των στερεών υπολειμμάτων των βοτάνων γίνεται για 24 και 48h. Στην συνέχεια απορρίπτεται το υπερκείμενο και διεγείρουμε τα κύτταρα με TNF-α, αφού προσθέσουμε σε κάθε βοθρίο 1mL θρεπτικού υλικού.

Διέγερση των κυττάρων με TNF-α

Στις καλλιέργειες των HT29 και PC3 κυττάρων, που έχουμε επιδράσει με τα διαλύματα των στερεών υπολειμμάτων των βοτάνων (όπως περιγράφηκε παραπάνω), σε τρυβλία επώασης των 12 βοθρίων, γίνεται επίδραση με τον προφλεγμονώδη παράγοντα TNF-α σε συγκέντρωση ίση προς 50ng/mL. Μετά από 24h επώασης (37°C, 95% υγρασία, 5% CO₂), το υπερκείμενο κάθε βοθρίου παραλαμβάνεται και μετρώνται τα επίπεδα της IL-8, ενώ συλλέγονται και τα κύτταρα που έχουν σχηματίσει μονόστιβο επιθήλιο στην επιφάνεια των βοθρίων, με σκοπό να μετρηθεί η ένταση στην έκφραση της πρωτεΐνης NF-κΒ p65.

Αντιδραστήρια-Όργανα

Φωτόμετρο ELISA (ELISA reader)

Εξειδικευμένο ELISA kit για τη μέτρηση της IL-8

Πιπέττες και tips

Πολυκάναλη πιπέττα

Απιονισμένο νερό

Φιαλίδια erpendorf, χωρητικότητας 1,5mL

Αρχή της μεθόδου

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

Αναλυτική Πορεία

Τα επίπεδα της IL-8 σε υπερκείμενο καλλιέργειας μετρώνται σε ELISA φωτόμετρο με χρήση εξειδικευμένου sandwich kit και σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρείας. Αρχικά προετοιμάζονται όλα τα αντιδραστήρια, τα δείγματα και τα στάνταρ σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Στα δείγματα γίνεται αραίωση 1:10. Στις αντίστοιχες θέσεις στο τρυβλίο επώασης προστίθεται αρχικά 200μL διαλύτη (Assay Diluent RD1-85) και 50μL control, standard ή δείγματος. Επωάζουμε για 2h σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί απομάκρυνση του υπερκείμενου και ξέπλυμα με το διάλυμα πλύσης 4 φορές. Μετά το τελευταίο ξέπλυμα απομακρύνουμε κάθε ίχνος υγρασίας και προστίθενται 100μL του πολυκλωνικού αντισώματος. Ακολουθεί επώαση για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το τέλος της επώασης

απομακρύνεται πάλι το υπερκείμενο και ξεπλένουμε με διάλυμα πλύσης για 4 φορές. Απομακρύνουμε κάθε ίχνος υγρασίας και προστίθενται 200μL από το υπόστρωμα. Επωάζουμε για άλλα 30min σε θερμοκρασία δωματίου και στο σκοτάδι. Στο τέλος προστίθενται 50μL διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης και μετράται η απορρόφηση στα 450nm. Για την έκφραση των αποτελεσμάτων σε pg/mL, κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Για την καμπύλη αναφοράς γίνονται διαδοχικές αραιώσεις με ρυθμιστικό διάλυμα από μητρικό διάλυμα IL-8 (2000 pg/mL). Οι τελικές συγκεντρώσεις είναι 1000, 500, 250, 125, 62,5 και 31,2 pg/mL. Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος $\psi=f(x)$, όπου x η συγκέντρωση της IL-8 σε pg/mL και ψ η απορρόφηση στα 450nm.

2.6.5 Μέτρηση του μεταγραφικού παράγοντα Πυρηνικού Παράγοντα-κΒ (NF-κΒ) p65

Αντιδραστήρια-όργανα

Φωτόμετρο ELISA (ELISA reader)

Εξειδικευμένο ELISA Kit για τη μέτρηση του NF-κΒ

Αυτόματες πιπέττες (1-1000μL), tips

Δοκιμαστικοί σωλήνες προπυλενίου των 5 ή 10mL με αντίστοιχα πώματα ανθεκτικά στο ακετονιτρίλιο

Φιαλίδια erpendorf, χωρητικότητας 1,5mL

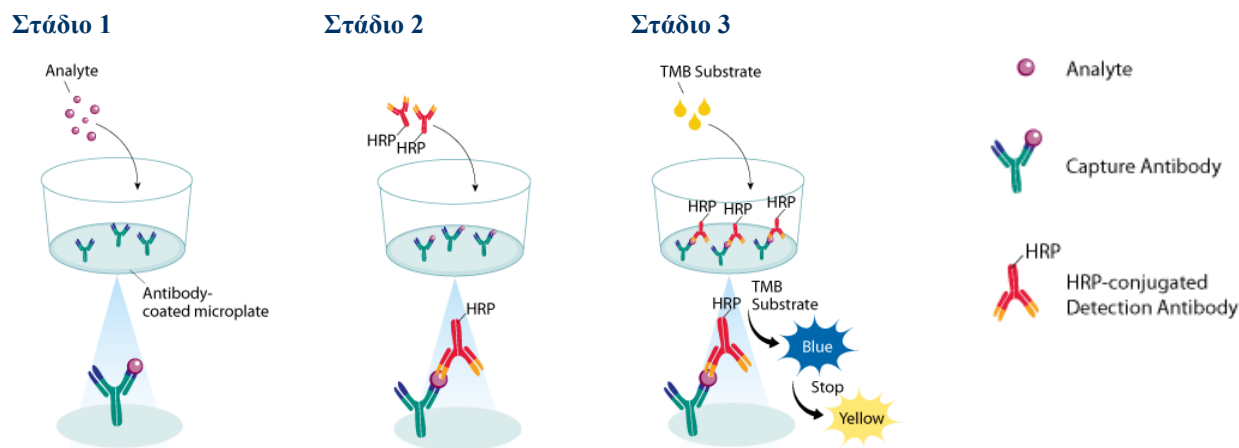
Πολυστυρενικό τρυβλίο 96 βοθρίων

Ρυθμιστικό διάλυμα PBS 20mM, pH 7.4

Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό

Αρχή της μεθόδου:

Μετά τη λύση των κυττάρων, η Phospho-NF-κΒ p65 πρωτεΐνη προσδένεται αρχικά σε μονοκλωνικό αντίσωμα (total-NF-κΒ p65 Mouse mAb) και στη συνέχεια προστίθεται πολυκλωνικό αντίσωμα ανιχνευτής (NF-κΒ p65 Rabbit mAb) της προσδεμένης πρωτεΐνης στο μονοκλωνικό αντίσωμα. Ακολουθεί πλύσιμο για απομάκρυνση άλλων πρωτεϊνών και προσθήκη anti-ενζύμου-υποστρώματος, όπου λαμβάνει χώρα χρωματομετρική αντίδραση. Το προϊόν της αντίδρασης απορροφά στα 450nm (Εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3 Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων που λαμβάνουν χώρα για τη μέτρηση του NFκB p65 Αναλυτική πορεία:

Λύση των κυττάρων

Στα κύτταρα προστίθεται παγωμένο διάλυμα PBS και αφού αυτό απομακρυνθεί, τοποθετείται 0.2mL διαλύματος λύσης των κυττάρων (cell lysis buffer) μαζί με 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride. Ακολουθεί επώαση για 5min σε πάγο και τα κύτταρα μεταφέρονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Με τη βοήθεια υπερήχων τα κύτταρα λύνονται και φυγοκεντρώνονται για 10min στους 4°C. Το υπερκείμενο διάλυμα που περιέχει τις πρωτεΐνες απομονώνεται, μεταφέρεται σε eppendorfs και φυλάσσεται στους -80 °C.

Ενεργοποίηση NF-κB

Για την αξιολόγηση της ενεργοποίησης του NF-κB μετρούνται τα επίπεδα της πρόδρομης πρωτεΐνης (NF-κB) p65. Τα επίπεδα της p65 μετρώνται σε ELISA φωτόμετρο με την εφαρμογή εξειδικευμένου sandwich Kit και σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρείας. Αρχικά, 100μL δείγματος αραιώνονται με Sample Diluent 1:1 και το διάλυμα αναδεύεται ισχυρά για κάποια δευτερόλεπτα. Ακολούθως, 100μL αραιωμένου δείγματος προστίθενται στις αντίστοιχες θέσεις στο τρυβλίο όπου έχει ήδη προσδεθεί το μονοκλωνικό αντίσωμα. Ακολουθεί επώαση για 2h στους 37 °C ή για 12h στους 4°C. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και ξεπλένεται με το διάλυμα πλύσης (4x200μL). Στο τρυβλίο προστίθενται 100μL από το διάλυμα πολυκλωνικού αντισώματος και επώάζεται για 1h στους 37 °C. Απομακρύνεται ξανά το υπερκείμενο και ξεπλένεται 4 φορές. Προστίθενται 100μL διαλύματος ενζύμου Streptavidin-HRP και επώάζεται στους 37°C για 30h. Απομακρύνεται πάλι το υπερκείμενο, ξεπλένεται 4 φορές και προστίθενται 100μL υποστρώματος (TMB). Επώάζεται στους 37°C για 10min ή 30min στους 25°C. Τέλος, προστίθενται 100μL διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης (H₂SO₄ 2N) και μετράται η απορρόφηση στα 450nm σε φωτόμετρο ELISA.

2.7 Στατιστική επεξεργασία

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο SPSS, version 18.00. Λόγω κανονικής κατανομής του πληθυσμού (Kolmogorov-Smirnov test), οι συγκρίσεις κατά ζεύγη έγιναν με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (one-way ANOVA) χρησιμοποιώντας το Tukey test (≥ 7 ομάδες σύγκρισης). Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $p < 0,05$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΥΤΗΣΗ

3.1 Παραλαβή αφυδατωμένου αφεψήματος

Αρχικό βήμα της πειραματικής διαδικασίας αποτέλεσε η παρασκευή ροφημάτων των προς μελέτη βοτάνων και στη συνέχεια η παραλαβή του στερεού υπολείμματος τους με τη μέθοδο της λυοφιλίωσης. Η απόδοση σε στερεό υπόλειμμα που υπολογίσθηκε παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1 Απόδοση σε στερεό υπόλειμμα βοτάνων ανά φλιτζάνι

Βότανο	Μάζα αφυδατωμένου ροφήματος (mg) ανά φλιτζάνι (200mL)
Αντωνάϊδα	368.1
Δενδρολίβανο	72.7
Δίκταμο	237.9
Θρύμπα	436.0
Θυμάρι	441.9
Μαντζουράνα	496.2
Ρίγανη	572.7
Σπαθόχορτο	624.7
Τσάι Βουνού	342.7
Φασκόμηλο	182.7
Φλισκούνι	402.7
Χαμομήλι	662.7

Από τις τιμές του Πίνακα φαίνεται ότι το Δενδρολίβανο είναι το βότανο που κατά τη λυοφιλίωση του αφεψήματος του έχει τη μικρότερη απόδοση σε στερεό υπόλειμμα (72,7mg/200mL), ενώ ακολουθεί το Φασκόμηλο (182,7mg/200mL). Αντίθετα, τις υψηλότερες τιμές σε στερεό υπόλειμμα έχει το Χαμομήλι (662,7mg/200mL) και το Σπαθόχορτο (624,7mg/200mL), ενώ τα υπόλοιπα αφεψήματα βοτάνων απέδωσαν συγκριτικά παρόμοιες τιμές στερεού υπολείμματος.

Βιβλιογραφικά, έχουν αναφερθεί ποικίλες μέθοδοι για την εκχύλιση των συστατικών των βοτάνων, καθώς και άλλων φαρμακευτικών φυτών. Οι διαλύτες που έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί είναι η μεθανόλη (Shan *et al.*, 2005, Wojdylo *et al.*, 2007), η αιθανόλη

(Djeridane *et al.*, 2006) και το νερό (Zheng & Wang, 2001, Ivanova *et al.*, 2005, Katalinic *et al.*, 2006, Kiselova *et al.*, 2006). Έχει αναφερθεί ότι η μέθοδος της εκχύλισης επηρεάζει την απόδοση σε στερεό υπόλειμμα των προς μελέτη φυτών και συγκεκριμένα, η πολικότητα του διαλύτη διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο (Nacz & Shahidi, 2006). Όσον αφορά στο νερό, αποτελεί ένα μέσο μεγάλης πολικότητας, σε σχέση με τα υπόλοιπα προαναφερθέντα οργανικά μέσα εκχύλισης, μειώνοντας την απόδοση σε αφυδατωμένο υπόλειμμα. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση των ροφημάτων σε στερεό υπόλειμμα είναι η κατάσταση του βοτάνου, ο χρόνος αποθήκευσης του, ο χρόνος εκχύλισης, η ποσότητα του βοτάνου προς εκχύλιση, η σύσταση του σε φυτοχημικά κ.α. (Nacz & Shahidi, 2006). Στην παρούσα μελέτη, η παρασκευή των αφεψημάτων έγινε ακολουθώντας τον παραδοσιακό τρόπο (Liolios *et al.*, 2010), στην προσπάθεια τα αποτελέσματα να μπορέσουν να συσχετιστούν με τη διατροφή και δεν επικεντρώθηκε, συνεπώς, στην αύξηση της απόδοσης των ροφημάτων σε στερεό υπόλειμμα.

3.2 Περιεχόμενο αφεψήματος σε φυσικά αντιοξειδωτικά

3.2.1 Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο αφεψημάτων

Δεν είναι λίγες οι έρευνες που έχουν γίνει στην προσπάθεια να προσδιοριστεί το φαινολικό περιεχόμενο των φαρμακευτικών φυτών. Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον έχουν συγκεντρώσει τα βότανα που ανήκουν στην οικογένεια Lamiaceae, λόγω των ποικίλων βιολογικών δράσεων που επιδεικνύουν (Fecka & Turek, 2008). Στην παρούσα ενότητα παρουσιάζεται το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο των υπό εξέταση βοτάνων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu (Πίνακας 3.2).

Όσον αφορά στα αποτελέσματα, το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο που περιέχει μια κούπα (200ml) αφεψήματος κυμαίνεται από 5.31 ± 4.24 έως 159.23 ± 17.0 , mg GAE. Το αφέψημα με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση πολυφαινόλων βρέθηκε να είναι το Σπαθόχορτο, σε αντίθεση με το Δενδρολίβανο που φάνηκε ότι έχει πολύ χαμηλή περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις. Σχετικά χαμηλή και περίπου στα ίδια επίπεδα βρέθηκε η συγκέντρωσή τους στην Αντωνιάδα, στο Φασκόμηλο και στο Χαμομήλι. Παρόμοιες ήταν επίσης οι συγκεντρώσεις σε πολυφαινόλες στη Ρίγανη, στο Φλισκούνι και στη Μαντζουράνα (61.87 ± 4.76 , 61.9 ± 2.03 και 59.2 ± 1.35 , αντίστοιχα), περίπου διπλάσιες από αυτές που βρέθηκαν στο Δίκταμο, στο Τσάι Βουνού και στο Θυμάρι (29.7 ± 5.2 , 21.5 ± 3.83 και 32.5 ± 5.5 , αντίστοιχα).

Η σύγκριση των αποτελεσμάτων του συνολικού φαινολικού περιεχομένου με αντίστοιχα από τη σύγχρονη βιβλιογραφία δεν είναι εύκολη καθώς στις περισσότερες έως τώρα μελέτες χρησιμοποιήθηκαν ως μέσο εκχύλισης οργανικοί διαλύτες και όχι νερό. Συγκεκριμένα, η

μεθανόλη είναι λιγότερο πολικός διαλύτης από το νερό και οι φαινολικές ενώσεις είναι διαλυτές στη μεθανόλη, κατά συνέπεια οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις των πολυφαινολών κυμαίνονται σε υψηλότερα επίπεδα (Yoo *et al.*, 2008). Επιπλέον, οι περισσότεροι ερευνητές εστιάζουν στην εξέταση παραδοσιακών βοτάνων από διαφορετικές χώρες, γεγονός που δε βοηθάει στην εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Έχει αναφερθεί ότι οι σημαντικές διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των αποτελεσμάτων οφείλονται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες και συγκεκριμένα στο κλίμα, στην περιοχή, στη θερμοκρασία, στη γονιμότητα, στις ασθένειες και στην έκθεση σε παράσιτα, στην ποικιλία, στην ωριμότητα, στην επιλογή των εξεταζόμενων τμημάτων και στην εποχή συλλογής των δειγμάτων (Kim & Lee, 2004, Shan *et al.*, 2005). Τέλος, άλλες παράμετροι που επηρεάζουν τα αποτελέσματα, δυσκολεύοντας τις συγκρίσεις με αποτελέσματα από άλλες μελέτες, είναι ο χρόνος βρασμού και η ποσότητα του βοτάνου για την παρασκευή του αφεψημάτος (Kratchanova *et al.*, 2010)

Πίνακας 3.2 Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο των αφεψημάτων, εκφρασμένο σε mg ισοδύναμων γαλλικού οξέος (GAE)

Βότανο	mg GAE/φλιτζάνι (200mL)
Αντωνάιδα	17.08 ±2.11
Δενδρολίβανο	5.31±4.24
Δίκταμο	29.7±5.2
Θρύμπα	52.6±1.33
Θυμάρι	32.5±5.5
Μαντζουράνα	59.2±1.35
Ρίγανη	61.87±4.76
Σπαθόχορτο	159.23±17.0
Τσάι Βουνού	21.5±3.83
Φασκόμηλο	18.66±1.85
Φλισκούνι	61.9±2.03
Χαμομήλι	17.73±2.55

3.2.2 Ολικές φλαβονόλες αφεψημάτων

Εκτός των συνολικών φαινολών, έγινε προσπάθεια να προσδιοριστούν οι ολικές φλαβονόλες οι περιεχόμενες στο αφέψημα. Οι φλαβονόλες, όπως έχει ήδη αναφερθεί στην υποενότητα 1.2.3, είναι μια κατηγορία πολυφαινολικών συστατικών (φλαβονοειδή) που επιδεικνύουν σημαντικές βιολογικές δράσεις και ανιχνεύονται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις στα διάφορα φαρμακευτικά φυτά. Σημαντικές φλαβονόλες είναι οι: κερκετίνη, μυρισετίνη, καμπφερόλη, φισετίνη, γκαλανγκίνη, μορίνη, ραμνετίνη και οι γλυκοζίτες της καρκετίνης: υπεροσίδη, ισοκερκιτίνη, κερκιτρίνη, ρουτίνη. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων, εκφρασμένα σε ισοδύναμα ρουτίνης, παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3.

Πίνακας 3.3 Συνολικό περιεχόμενο φλαβονόλες στα αφεψήματα, εκφρασμένο σε mg ισοδύναμων ρουτίνης

Βότανα	mg Ρουτίνης /φλιτζάνι (200mL)
Αντωναΐδα	8.3±0.22
Δενδρολίβανο	3.2±0.10
Δίκταμο	11.9±0.04
Θρύμπα	29.9±0.67
Θυμάρι	18.6±0.12
Μαντζουράνα	35.5±0.24
Ρίγανη	40.0±0.31
Σπαθόχορτο	63.2±0.45
Τσάι Βουνού	16.2±0.07
Φασκόμηλο	16.1±0.22
Φλισκούνι	13.2±0.18
Χαμομήλι	25.2±0.35

Το περιεχόμενο των αφεψημάτων σε φλαβονόλες κυμάνθηκε μεταξύ 3.2±0.10 και 63.2±0.45. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών φλαβονολών ανιχνεύθηκε στο Σπαθόχορτο, ενώ η μικρότερη στο Δενδρολίβανο. Αρκετά χαμηλό περιεχόμενο σε φλαβονόλες βρέθηκε να έχει και η Αντωναΐδα. Όσον αφορά τα υπόλοιπα αφεψήματα βοτάνων, με αύξουσα συγκέντρωση ολικών φλαβονολών κατατάσσονται ως εξής: Δίκταμο < Φλισκούνι < Φασκόμηλο < Τσάι Βουνού < Θυμάρι < Χαμομήλι < Θρύμπα < Μαντζουράνα < Ρίγανη.

Η απόδοση σε ολικές φλαβονόλες επηρεάζεται από το μέσο εκχύλισης καθώς και από την πορεία που ακολουθείται για την παρασκευή του ροφήματος. Αυτή μπορεί να είναι και μια πιθανή ερμηνεία για τις συγκεντρώσεις ολικών φλαβονολών που ανιχνεύθηκαν.

3.3 Αντιοξειδωτική δράση

Όπως έχει ήδη αναφερθεί πολλά είναι τα φυτά που διαθέτουν ιδιότητες που σχετίζονται με τη πρόληψη, ίαση ή/και τη συμπληρωματική θεραπεία ποικίλων ασθενειών. Αυτές οι ικανότητες αποδίδονται στην παρουσία συστατικών, όπως βιταμίνες, πολυφαινόλες, τερπένια κ.α. (Suhaj, 2006). Μία από τις κύριες δράσεις που εμφανίζουν είναι η αντιοξειδωτική. Στην παρούσα ενότητα εξετάζεται η ικανότητα των αφεψημάτων των υπό μελέτη βοτάνων να δρουν ως φυσικά αντιοξειδωτικά, μελετώντας την ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH* και αναγωγής του Fe^{+++} σε Fe^{++} . Τα αποτελέσματα παρατίθενται στους Πίνακες 3.4 και 3.5.

Πίνακας 3.4 Ικανότητα των αφεψημάτων των βοτάνων να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH*, εκφρασμένη σε mg ισοδύναμων Trolox

Βότανα	mg TE/φλιτζάνι (200mL)
Αντωνιάδα	53.3±3.06
Δενδρολίβανο	7.7±0.85
Δίκταμο	141.7±5.57
Θρύμπα	130.9±6.13
Θυμάρι	70.5±4.29
Μαντζουράνα	149.6±2.44
Ρίγανη	201.3±18.07
Σπαθόχορτο	430.8±8.45
Τσάι Βουνού	52.3±2.69
Φασκόμηλο	52.8±0.64
Φλισκούνι	179.5±4.99
Χαμομήλι	79.2±6.21

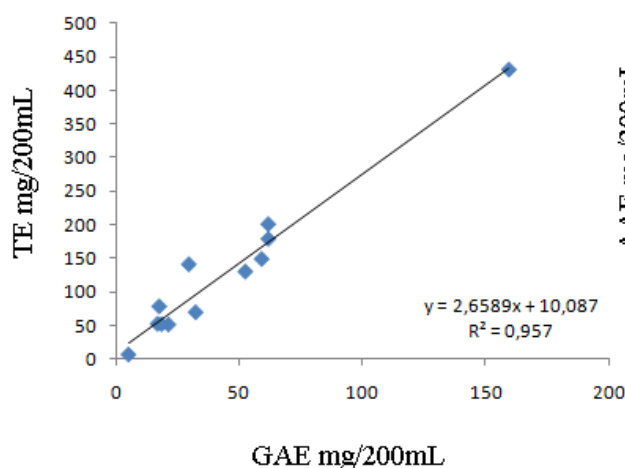
Πίνακας 3.5 Αποτελέσματα προσδιορισμού αναγωγικής δύναμης αφεψημάτων, εκφρασμένα σε mg ισοδύναμων ασκορβικού οξέος

Βότανα	mg AAE /φλιτζάνι (200mL)
Αντωναΐδα	4.7±0.17
Δενδρολίβανο	0.5±0.07
Δίκταμο	16.5±0.72
Θρύμπα	17.0±1.38
Θυμάρι	6.8±0.15
Μαντζουράνα	19.1±1.06
Ρίγανη	29.1±2.75
Σπαθόχορτο	66.5±1.50
Τσάι Βουνού	6.7±0.08
Φασκόμηλο	4.7±0.41
Φλισκούνι	20.2±0.75
Χαμομήλι	7.5±0.39

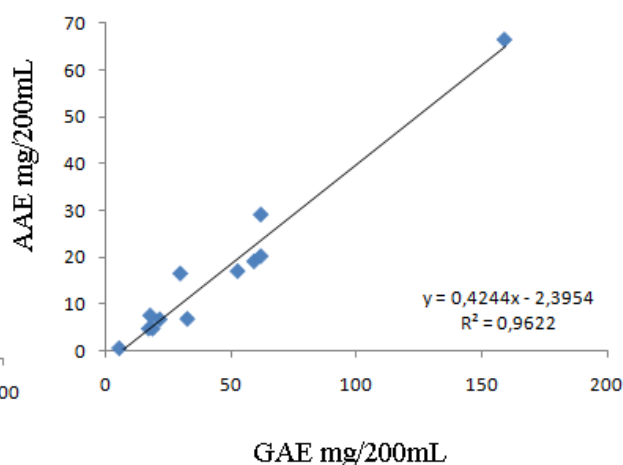
Όλα τα αφεψήματα των βοτάνων της μελέτης παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση, καθώς φαίνεται να περιέχουν συστατικά που έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH[•] και να λειτουργούν ως δότες ηλεκτρονίων, όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της. Αναφορικά με την κατάταξη των βοτάνων, σε σχέση με την αντιοξειδωτική τους δράση, είναι παρόμοια και στις δυο τεχνικές προσδιορισμού της. Συγκεκριμένα, το Σπαθόχορτο παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση, ενώ και πάλι το Δενδρολίβανο είναι αυτό που κατατάσσεται τελευταίο. Είναι σημαντικό να τονισθεί ότι το Σπαθόχορτο παρουσιάζει διπλάσια σχεδόν αντιοξειδωτική δράση από τη Ρίγανη, που είναι δεύτερη στην κατάταξη. Η μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα της Ρίγανης έχει ήδη αναφερθεί βιβλιογραφικά (Albana & Miguel, 2010) και έχει συσχετιστεί με διάφορα συστατικά της όπως την καρβακρόλη, το γ-τερπινένιο, το ροσμαρινικό οξύ, τη θυμόλη κ.α. (Braga *et al.*, 2006, Tsai *et al.*, 2007). Επιπλέον, σε μια έρευνα που μελετά την αντιοξειδωτική ικανότητα πέντε βοτάνων της οικογένειας Lamiaceae βρέθηκε ότι η Ρίγανη διαθέτει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση συγκριτικά με το Θυμάρι, το Φασκόμηλο, το Δενδρολίβανο, τη Μέντα και το Βασιλικό, κάτι που επαληθεύεται και στην παρούσα μελέτη (Shan *et al.*, 2005). Τα ευρήματα αυτά ενισχύονται και από μια ακόμα μελέτη, στην οποία βρέθηκε ότι το Θυμάρι διαθέτει αντιοξειδωτική δράση, μικρότερη όμως από αυτήν της Ρίγανης (Kulisic *et al.*, 2006).

Μεγάλη αντιοξειδωτική δράση εμφανίζει επίσης και το Φλισκούνι κάτι που έχει παρατηρηθεί και σε μια πρόσφατη έρευνα (Guimaraes *et al.*, 2011). Η Μαντζουράνα παρουσιάζει επίσης μεγάλη ικανότητα να δεσμεύει την ελεύθερη ρίζα DPPH[•] ενώ ακολουθεί το Δίκταμο, η αντιοξειδωτική δράση του οποίου έχει αναφερθεί και στη βιβλιογραφία (Moller *et al.*, 1999). Η Θρύμπα είναι το έκτο βότανο στην κατάταξη, κατά σειρά φθίνουσας αντιοξειδωτικής δράσης, η ικανότητα της οποίας έχει επίσης καταγραφεί στο παρελθόν (Madsen *et al.*, 1998, Exarchou *et al.*, 2002, Radonic & Milos, 2003). Τέλος, τις τελευταίες θέσεις καταλαμβάνουν το Χαμομήλι, το Θυμάρι, η Αντωναΐδα, το Φασκόμηλο και το Τσάι Βουνού.

Για να προσδιοριστεί πού οφείλεται η ικανότητα των βοτάνων να επιδεικνύουν αντιοξειδωτική δράση, έγινε συσχέτιση του συνολικού φαινολικού περιεχομένου τους με την ικανότητα να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH[•] και με την αναγωγική τους δύναμη. Σε πολλές των περιπτώσεων έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά ότι υπάρχει συσχέτιση του φαινολικού περιεχομένου των βοτάνων με την αντιοξειδωτική δράση (Zheng & Wang 2001, Shan *et al.*, 2005, Djeridane *et al.*, 2006, Katalinic *et al.*, 2006). Ωστόσο, υπάρχουν και μελέτες που δεν έχει παρατηρηθεί αυτή η σχέση (Kahkonen *et al.*, 1999), ενώ σε άλλες βρέθηκε μικρή συσχέτιση ή το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο και η αντιοξειδωτική ικανότητα αναφέρθηκαν χωρίς κανένα σχόλιο (Capecka *et al.*, 2005, Wong *et al.*, 2006). Στα Σχήματα 3.1 και 3.2 παρουσιάζεται η συσχέτιση μεταξύ ολικού φαινολικού περιεχομένου και αντιοξειδωτικής ικανότητας της παρούσας μελέτης.



Σχήμα 3.1 Συσχέτισης ολικού φαινολικού περιεχομένου με την ικανότητα δέσμευσης της ρίζας DPPH[•] των 12 βοτάνων της μελέτης. GAE=ισοδύναμο γαλλικού οξέος, TE=ισοδύναμο Trolox



Σχήμα 3.2 Διάγραμμα συσχέτισης φαινολικού περιεχομένου με την αναγωγική δύναμη των 12 βοτάνων της μελέτης. GAE=ισοδύναμο γαλλικού οξέος, AAE=ισοδύναμο ασκορβικού οξέος

Βρέθηκε, όπως διακρίνεται και από τα παραπάνω διαγράμματα, ότι υπάρχει πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ του συνολικού φαινολικού περιεχομένου και της αντιοξειδωτικής ικανότητας

των βοτάνων της μελέτης. Συγκεκριμένα, ο συντελεστής συσχέτισης R ισούται με 0,957 και 0,9622 μεταξύ του συνολικού φαινολικού περιεχομένου, της ικανότητας δέσμευσης της DPPH[•] και της αναγωγικής δύναμης, αντίστοιχα. Πρέπει να επισημανθεί ότι η σχέση μεταξύ ορισμένων συστατικών και αντιοξειδωτικής δράσης είναι δύσκολο να εξηγηθεί από άποψη μόνο ποσοτικής ανάλυσης. Αν και η συσχέτιση αυτή υποδηλώνει ότι η αντιοξειδωτική δράση των βοτάνων μπορεί να αποδοθεί σε σημαντικό βαθμό στο συνολικό φαινολικό περιεχόμενο τους, υπάρχουν κάποιες ασυμφωνίες. Για παράδειγμα, ενώ το Δίκταμο και η Θρύμπα βρέθηκε ότι έχουν το ίδιο περίπου περιεχόμενο σε ολικά φαινολικά συστατικά (29,7 και 32,5mg GAE/200mL, αντίστοιχα) δεν παρουσιάζουν την ίδια αντιοξειδωτική ικανότητα (141,7mg TE/200mL και 16,5mg AAE/200mL, για το Δίκταμο και 70,5mg TE/200mL και 6,8mg AAE/200mL, για τη Θρύμπα). Για την ερμηνεία στις παρατηρήσεις αυτές μπορούν να διατυπωθούν διάφορες υποθέσεις. Αρχικά, τα βότανα που χρησιμοποιήθηκαν διαφέρουν ως προς το είδος των πολυφαινολών που περιέχουν. Έχει ήδη αναφερθεί ότι το είδος και η δομή των φαινολικών συστατικών επηρεάζουν πολύ την αντιοξειδωτική τους συμπεριφορά (Ou *et al.*, 2002). Επιπλέον, τα αφεψημάτα των βοτάνων δεν αποτελούνται αποκλειστικά από φαινολικά συστατικά, αλλά και από άλλες ουσίες, πχ τερπένια που μπορεί να εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση. Τέλος, τα διάφορα συστατικά των βοτάνων μπορεί να παρουσιάζουν συνεργιστική ή/και ανταγωνιστική συμπεριφορά μεταξύ τους, αλλά και με άλλες ουσίες παρούσες στο αφέψημα, επηρεάζοντας έτσι την αντιοξειδωτική τους ικανότητα (Zaporozhets *et al.*, 2004, Kratchanova *et al.*, 2010). Παρόλο αυτά, τα αποτελέσματα δείχνουν τη σημαντικότητα των φαινολικών ενώσεων στην αντιοξειδωτική συμπεριφορά των ροφημάτων των βοτάνων, καθώς και τη μοναδική συνεισφορά τους στην αντιοξειδωτική ικανότητα.

Έχοντας μια εκτίμηση για τη σύσταση και την αντιοξειδωτική δράση των βοτάνων, θα γίνει μια σύντομη αναφορά στις δράσεις που παρουσιάζουν τα διάφορα συστατικά. Συχνά αναφέρεται ότι τα φυτοχημικά ασκούν προστατευτική δράση έναντι ασθενειών. Τα ευρήματα έχουν προκύψει μέσα από απλές παρατηρήσεις και έχουν επιβεβαιωθεί από επιδημιολογικές μελέτες καθώς και από κλινικές δοκιμές, στις οποίες επισημαίνεται ο προστατευτικός ρόλος των φυτοχημικών στην υγεία. Από τις πρώτες έρευνες στην οποία παρατηρήθηκε η σημασία των συστατικών αυτών στην πρόληψη ασθενειών, συγκεκριμένα στην πρόληψη της καρδιαγγειακής νόσου, ήταν η μελέτη των Επτά Χωρών. Σύμφωνα με τα ευρήματα της μελέτης, η Μεσογειακή Διατροφή, που χαρακτηρίζεται από την αυξημένη κατανάλωση ψαριών, φρούτων, λαχανικών, αλλά και παραδοσιακών αφεψημάτων, έχει προστατευτικό ρόλο στην υγεία (Keys & Keys, 1975). Αργότερα, και άλλες επιδημιολογικές μελέτες που επιβεβαίωσαν την αρνητική συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης των πλούσιων σε φαινολικά συστατικά φρούτων και λαχανικών και

της καρδιαγγειακής νόσου (Ness & Powles, 1997, Hu, 2003, Dauchet *et al.*, 2005, Nothlings *et al.*, 2008). Ανάμεσα στα συστατικά στα οποία αποδίδονται αυτές οι ιδιότητες περιλαμβάνονται οι πολυφαινόλες, καθώς και άλλα εκ των φυτοχημικών (Trichopoulou & Lagiou, 1997). Αναφορικά με την καρδιαγγειακή νόσο, μελέτες σε ανθρώπους και σε πειραματόζωα υποστηρίζουν ότι η οξείδωση της LDL διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της αθηροσκλήρωσης (Berliner & Heinecke, 1996). Το μόριο της LDL είναι ιδιαίτερα ευάλωτο στο οξειδωτικό στρες (Belcher *et al.*, 1999). Η μη τροποποιημένη LDL δεν είναι σημαντικά τοξική, η οξειδωμένη της όμως μορφή ενοχοποιείται για την έναρξη της αθηροσκληρωτικής διαδικασίας (Pietzsch and Julius, 2001). Έτσι, τα οξειδωμένα λιποπρωτεϊνικά μόρια δεσμεύονται από τους υποδοχείς-εκκαθαριστές των μακροφάγων, συνεπεία του οποίου είναι η συσσώρευση μακροφάγων και η επαγωγή μηχανισμών που οδηγούν στη δημιουργία λιποειδών ραβδώσεων, πρόδρομο μορφή αθηρωματικής πλάκας (Frostegard *et al.*, 1999). Ουσίες που παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση έχουν μελετηθεί ως προς την ικανότητα τους να αναστέλλουν την οξείδωση της LDL και με αυτό τον τρόπο να δρουν προστατευτικά έναντι της καρδιαγγειακής νόσου. Τα ευρήματα ποικίλων ερευνών υποστηρίζουν ότι πολλά φαινολικά συστατικά παρουσιάζουν τέτοιου είδους αντιοξειδωτική ικανότητα (Visioli *et al.*, 1995, Visioli *et al.*, 2000).

Τα τελευταία χρόνια εξετάζεται, επίσης, η σχέση που υπάρχει μεταξύ των φυτοχημικών και των διαφόρων νευροεκφυλιστικών ασθενειών, όπως η νόσος του Parkinson και του Alzheimer. Και οι δυο ασθένειες έχουν συνδεθεί με το οξειδωτικό στρες. Υπάρχει ένας αυξημένος αριθμός μελετών μέσα από τις οποίες έχει βρεθεί ότι τα φαινολικά συστατικά φρούτων και λαχανικών, τα οποία παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση, έχουν την ικανότητα να εμποδίζουν ή να μειώνουν το θάνατο των νευρικών κυττάρων. Φαίνεται, επομένως ότι οι πολυφαινόλες αποτελούν μόρια με ιδιαίτερη σημασία για την αντιμετώπιση τέτοιου είδους εκφυλιστικών νοσημάτων (Boudet, 2007).

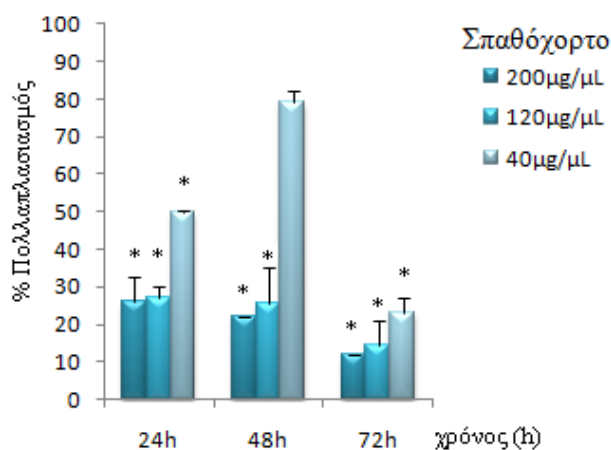
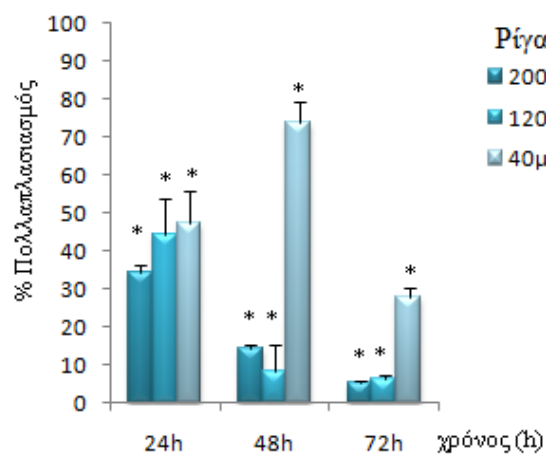
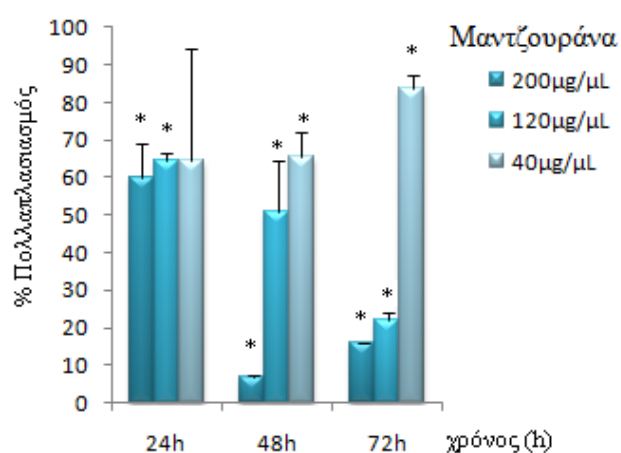
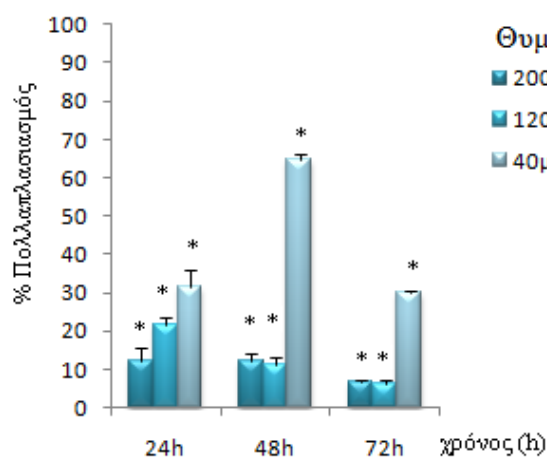
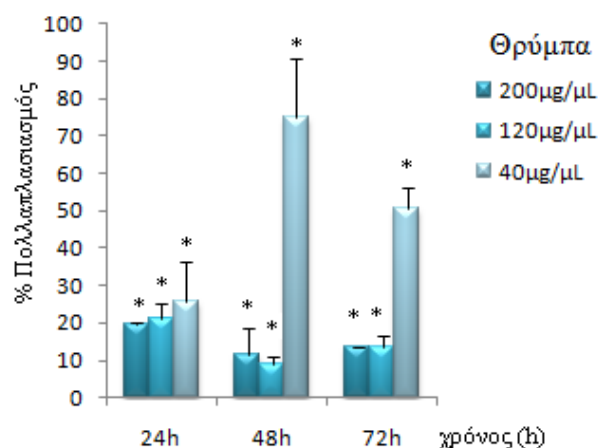
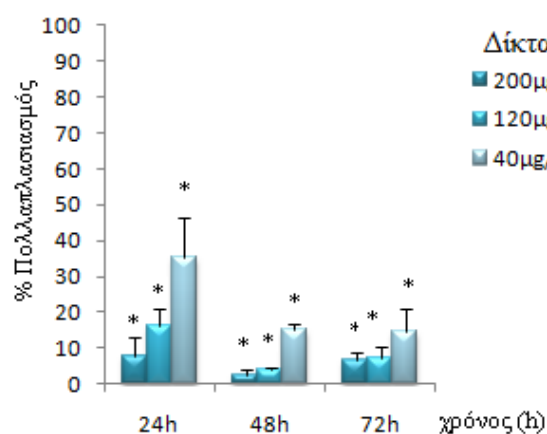
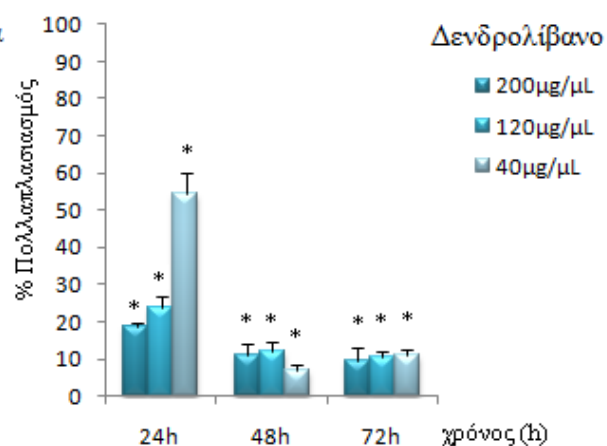
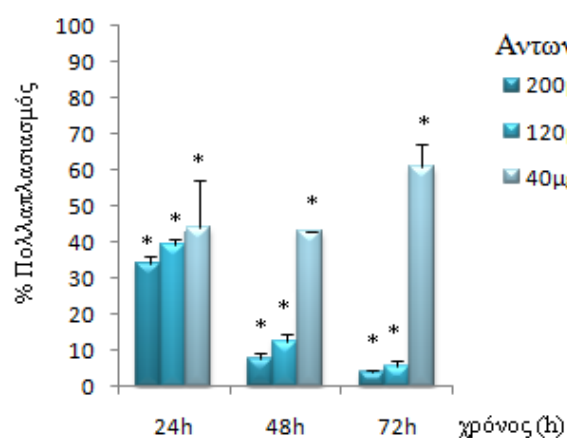
Τέλος, τα φυτοχημικά, όπως έχει γίνει ήδη λόγος στο Κεφάλαιο I, επηρεάζουν τις διαδικασίες έναρξης, προαγωγής και εξέλιξης του καρκίνου. Ο καρκίνος είναι μια σημαντική νόσος, που είναι υπεύθυνη για πολλούς θανάτους ετησίως σε παγκόσμιο επίπεδο. Πρόκειται για μια εκφυλιστική ασθένεια, που μπορεί να προσβάλλει άτομα κάθε ηλικίας, κυρίως όμως άνω των 50 ετών, ανάλογα με τον τύπο. Επιπρόσθετα, εκτός από τους τύπους καρκίνου που οφείλονται σε κληρονομικά αίτια, έχει βρεθεί ότι το 35% της θνησιμότητας που προκαλείται από αυτή τη νόσο μπορεί να αποδοθεί στη διατροφή (Doll & Petto, 1981). Ωστόσο, ευρήματα επιδημιολογικών ερευνών σχετίζουν την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου. Ο Block και οι συνεργάτες του (1992), εξετάζοντας τα αποτελέσματα που προέκυψαν

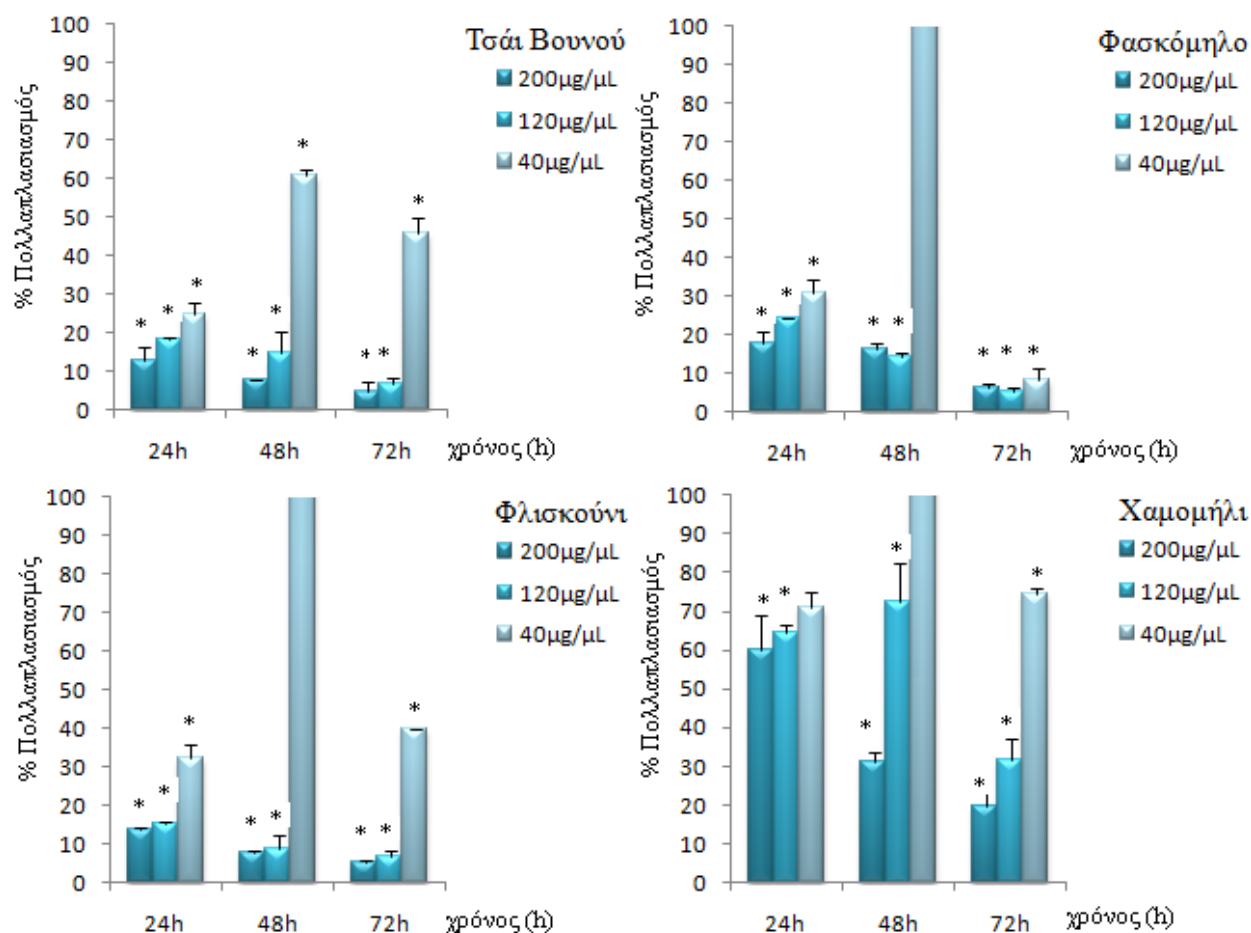
από 200 επιδημιολογικές μελέτες, στις οποίες ερευνήθηκε η συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης φρούτων και λαχανικών και της εμφάνισης διαφόρων τύπων καρκίνου (μαστού, κόλου, πνευμόνων, στοματικής κοιλότητας, οισοφάγου, παγκρέατος κ.α.), αναφέρουν την προστατευτική δράση των τροφών αυτών στη πλειοψηφία των μελετών. Στην προσπάθεια να αποδοθεί η δράση αυτή στα συστατικά των φυτικών οργανισμών, έγιναν κλινικές δοκιμές εξετάζοντας κάποιες από τις ενώσεις που περιέχουν ξεχωριστά. Τα ευρήματα δεν βρέθηκαν να συμφωνούν με αυτά που προέκυψαν από τις επιδημιολογικές μελέτες, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι μάλλον υπάρχει συνεργιστική δράση μεταξύ των διαφόρων συστατικών (Ommen *et al.*, 1996).

Στη συνέχεια παρατίθενται και αναλύονται τα αποτελέσματα που προκύψαν από τη μελέτη της δράσης των αφεψημάτων των 12 βοτάνων ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επίδραση που παρουσιάζουν σε δείκτες φλεγμονής σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου (HT29) και του προστάτη (PC3).

3.4 Μελέτη της επίδρασης των αφεψημάτων των βοτάνων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στις κυτταρικές σειρές HT29 και PC3

Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός είναι μια διαδικασία που υπόκειται αύξησης ρύθμισης. Για να συμβεί αυτό πολλά μόρια λαμβάνουν μέρος στη διαδικασία ανάπτυξης και αντιγραφής των κυττάρων. Εκτός του πολλαπλασιασμού, ζωτική σημασία για τη φυσιολογική ανάπτυξη του κυττάρου έχει και η απόπτωση. Ο όρος αυτός περιγράφει τις διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα κατά τον «προγραμματισμένο» κυτταρικό θάνατο. Για τη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού είναι απαραίτητη η συντονισμένη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης των κυττάρων. Σε ασθένειες, όπως ο καρκίνος η ισορροπία μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού και απόπτωσης έχει διαταραχθεί. Τα καρκινικά κύτταρα αυξάνονται και πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα, λόγω κάποιας μετάλλαξης, και «πλαστογραφούν» προ-αυξητικά μηνύματα, όντας συνεχώς υπό εντολή πολλαπλασιασμού. Για την αντιμετώπιση της ασθένειας, τα περισσότερα φάρμακα στοχεύουν στην αναστολή του πολλαπλασιασμού, ενεργοποιώντας ενδογενείς μηχανισμούς αυτοκαταστροφής, όπως δέσμευση κάποιου αυξητικού παράγοντα ή αναστολή ενεργοποίησης του υποδοχέα του. Στην παρούσα ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα πειραμάτων που κατέγραψαν τη δοσο- και χρονο-εξαρτώμενη ικανότητα των αφεψημάτων των βοτάνων, ως προς το να αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου και του προστάτη.





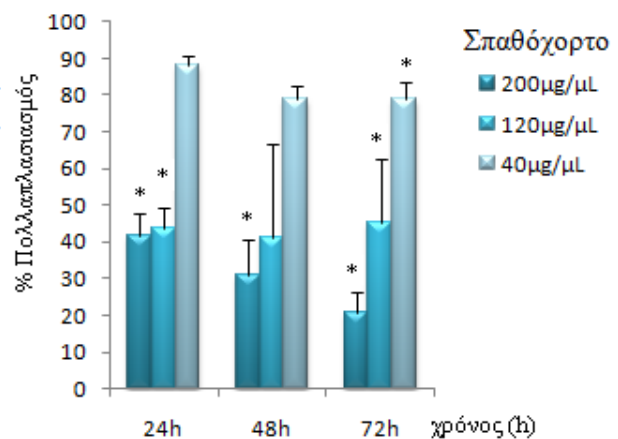
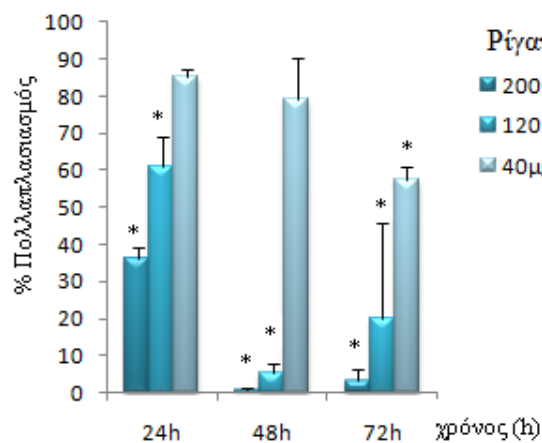
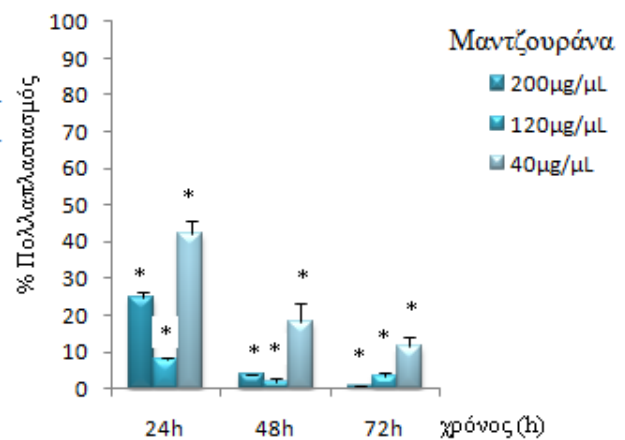
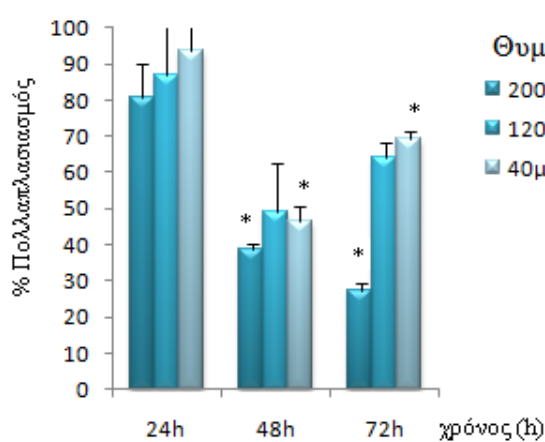
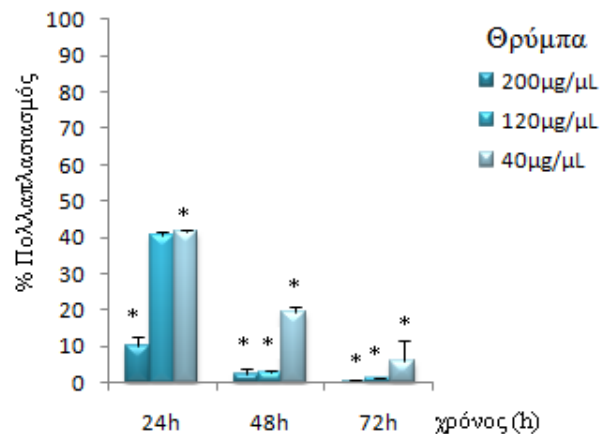
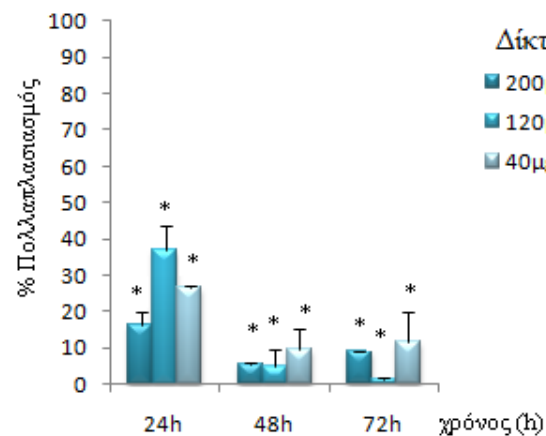
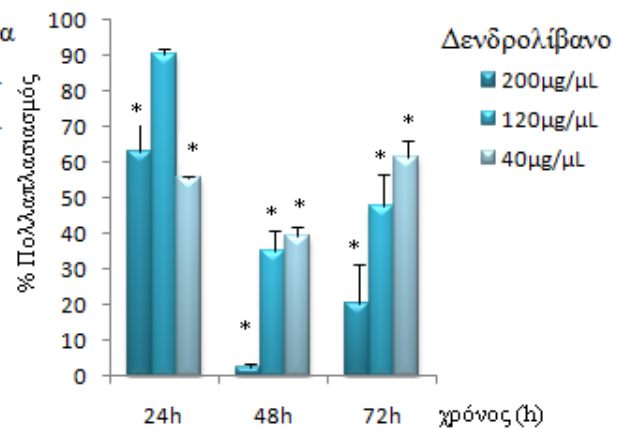
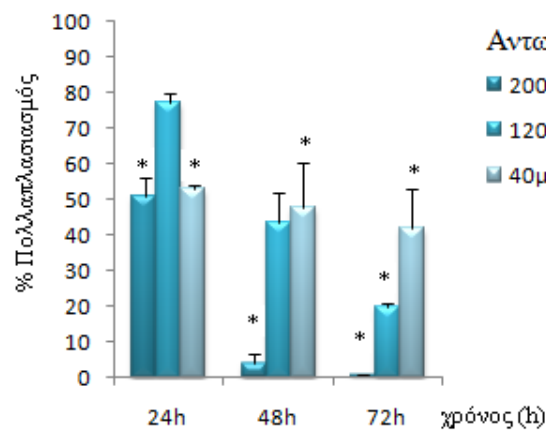
Σχήμα 3.2 Επίδραση των αφεψημάτων των 12 βοτάνων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των HT29. Ο (*) στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δε χορηγήθηκε κανένα αφέψημα και θεωρήθηκαν ότι είχαν 100% πολλαπλασιασμό, και εκείνων που επώαστηκαν με τα αφεψήματα των βοτάνων, για 24, 48 και 72h, σε συγκεντρώσεις 200, 120 και 40µg/µL. Οι τιμές είναι ο μ.ο.±S.D. δυο πειραμάτων

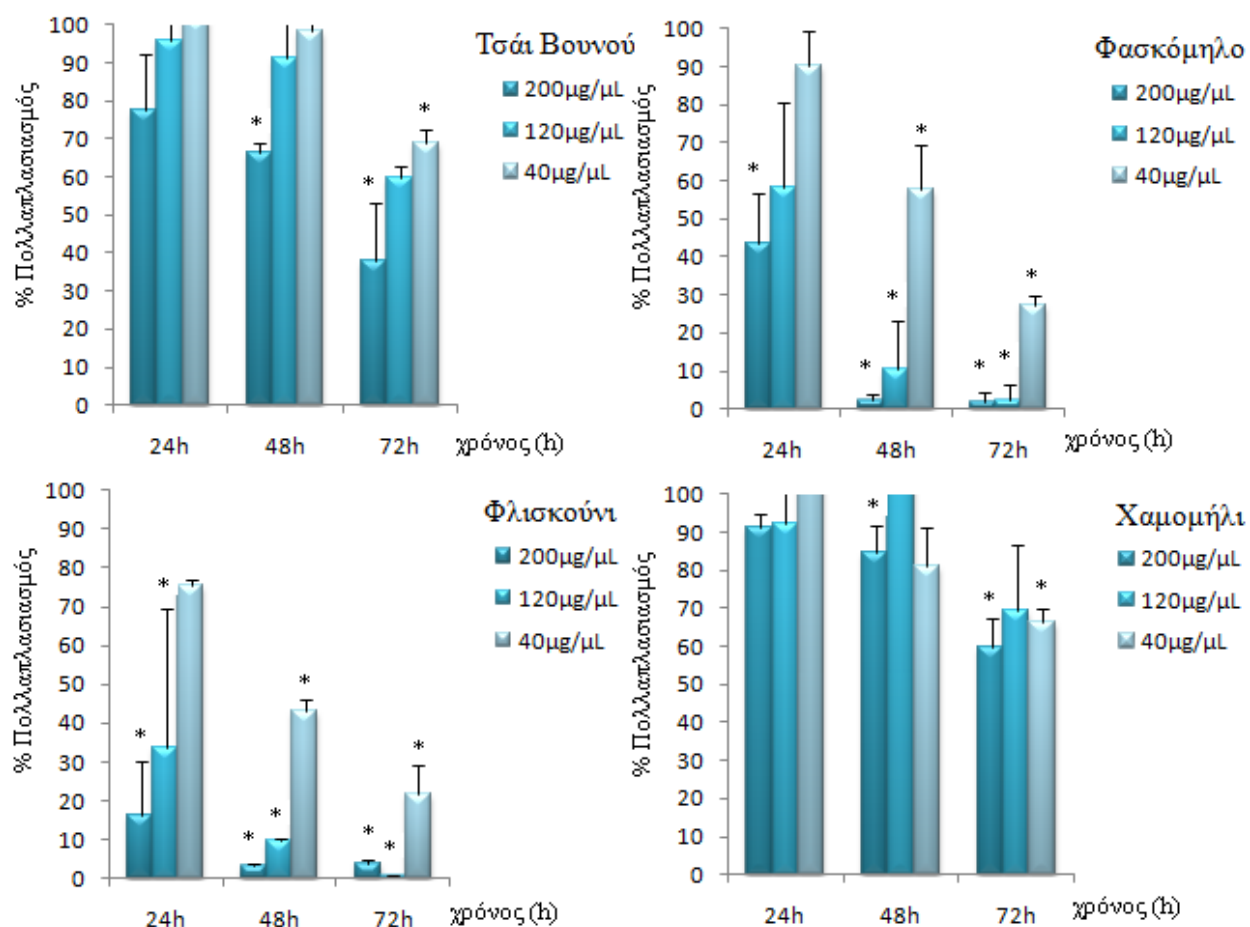
Στο Σχήμα 3.3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά από επίδραση των αφεψημάτων, διαφορετικών συγκεντρώσεων (40, 120, 200µg/µL), στα HT29 για 24, 48 και 72h και τα οποία εκφράζουν την % ικανότητα των κυττάρων να πολλαπλασιάζονται, σε σχέση με το control, για το οποίο η ικανότητα πολλαπλασιασμού λαμβάνεται ως 100%. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων θα γίνει για κάθε βότανο ξεχωριστά, ενώ στο τέλος θα γίνει και μια σύγκριση της δραστηριότητας των βοτάνων με βάση την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Το αφέψημα της Αντωναΐδας φάνηκε να έχει μεγάλη ικανότητα να αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των HT29 με δοσο- και χρονο- εξαρτώμενο τρόπο. Συγκεκριμένα, η αναστολή του πολλαπλασιασμού ήταν μεγαλύτερη από 50% ήδη από τις 24h σε όλες τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν. Η δράση της αυτή φαίνεται να αυξάνεται μετά από 48 και 72h στις συγκεντρώσεις 120 και 200µg/µL, αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό περισσότερο από 90%, ενώ στη συγκέντρωση 40µg/µL, η μείωση παρέμεινε στα ίδια επίπεδα. Το αφέψημα του Δενδρολίβανου, επίσης ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε όλες τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν. Μετά από 24h επώασης με το συγκεκριμένο αφέψημα

φαίνεται ότι υπάρχει θετική συσχέτιση της αναστολής του πολλαπλασιασμού με τη συγκέντρωση που χορηγήθηκε, και συγκεκριμένα η μείωση ήταν περίπου 80% μετά από επίδραση με 200μg/μL αφεψήματος, 77% για τη συγκέντρωση 120μg/μL και 45% για τη συγκέντρωση 40μg/μL. Επιπρόσθετα, επώαση των κυττάρων για 48h με το αφέψημα του Δενδρολίβανου φαίνεται να εμποδίζει ακόμα περισσότερο τον πολλαπλασιασμό, χωρίς όμως η δράση αυτή να επηρεάζεται από τη συγκέντρωση που χορηγήθηκε, αφού η μείωση ήταν περίπου 85% για όλες τις δόσεις. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και μετά από επώαση για 72h, με την % μείωση να παραμένει στα ίδια επίπεδα, κάτι που μπορεί να σημαίνει ότι η δράση του Δενδρολίβανου να αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μετά από 48h είναι δοσο- και χρόνο- ανεξάρτητη. Αναφορικά με τη δράση του αφεψήματος του Δίκταμου, φαίνεται ότι και αυτό μπορεί να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό, και μάλιστα σε αρκετά σημαντικό βαθμό, αφού η μείωση του πολλαπλασιασμού ήταν > 90%, για τη συγκέντρωση 200μg/μL μετά από 24h επώασης. Μεγάλη δραστηριότητα φαίνεται να έχει και η χαμηλή συγκέντρωση (40μg/μL), όπου μετά από επώαση 24h, η μείωση του πολλαπλασιασμού που σημειώθηκε ήταν της τάξης του 60%. Η σχέση δοσοεξάρτησης παρατηρείται επίσης και μετά από επώαση για 48 και 72h, ωστόσο η μείωση του πολλαπλασιασμού φαίνεται να παραμένει σταθερή σε αυτούς τους χρόνους (περίπου 95% για τις συγκεντρώσεις 120 και 200μg/μL και 75% για την 40μg/μL). Το αφέψημα της Θρύμπας ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων κατά 80% στην υψηλότερη συγκέντρωση μετά από επώαση για 24h, ενώ κάτι ανάλογο παρατηρήθηκε και για τις άλλες δόσεις. Επιπλέον, η δράση του αφεψήματος φαίνεται να έχει θετική συσχέτιση με το χρόνο, αλλά όχι με τη δόση, αφού μετά από 48h επώασης η πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων ήταν της τάξης του 10% και για τις δυο μεγάλες συγκεντρώσεις. Η ίδια αναστολή παρατηρείται και μετά από 72h επώασης σε αυτές τις συγκεντρώσεις. Αυτό που πρέπει να τονισθεί είναι ότι κατά την επίδραση με το αφέψημα αυτό, σε συγκέντρωση 40μg/μL, η αναστολή του πολλαπλασιασμού που παρατηρήθηκε παρουσιάζει αρνητική συσχέτιση με το χρόνο επώασης. Όσον αφορά το αφέψημα από Θυμάρι, η ικανότητα του να αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό είναι αρκετά μεγάλη. Συγκεκριμένα, η αναστολή του πολλαπλασιασμού είναι πάνω από 90% μετά από 72h επώασης στις συγκεντρώσεις 120 και 200μg/μL. Η σχέση δοσοεξάρτησης είναι εμφανής μόνο στις 24h, ενώ η επίδραση με τη συγκέντρωση 40μg/μL δεν παρουσιάζει κάποια συσχέτιση με το χρόνο επώασης. Τα αποτελέσματα σχετικά με το αφέψημα της Μαντζουράνας και τη δράση της να αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό είναι αρκετά αξιόλογα μετά από 48h επώασης σε συγκέντρωση 200μg/μL. Σε αυτό το χρόνο επώασης είναι εμφανής και μια σχέση δοσοεξάρτησης. Επίσης, παρατηρώντας συνολικά τα αποτελέσματα για το συγκεκριμένο αφέψημα, φαίνεται ότι υπάρχει και θετική συσχέτιση με το χρόνο επώασης με την ικανότητα αναστολής του πολλαπλασιασμού

μόνο στις μεγάλες συγκεντρώσεις. Αντίθετα στη μικρή συγκέντρωση δεν παρατηρείται αυτή η σχέση. Συνεχίζοντας, δοσο- και χρόνο- εξάρτηση υπάρχει και στη δράση του αφέψηματος της Ρίγανης στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των HT29 κυττάρων. Η μεγαλύτερη μείωση του πολλαπλασιασμού σημειώθηκε στις 72h επώασης για τη συγκέντρωση 200μg/μL, η οποία ήταν περίπου 95%. Το αφέψημα από το Σπαθόχορτο έχει επίσης την ικανότητα να αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με δοσο- και χρόνο- εξαρτώμενο τρόπο, όπου και πάλι η μεγαλύτερη μείωση παρατηρείται στις 72h επώασης στη συγκέντρωση 200μg/μL. Μεγάλη ικανότητα στην αναστολή του πολλαπλασιασμού βρέθηκε και για το Τσάι Βουνού. Συγκεκριμένα, η ικανότητα των κυττάρων να πολλαπλασιάζονται μετά από επώαση για 72h με το αφέψημα του βοτάνου αυτού, σε συγκέντρωση 200μg/μL, δεν ξεπέρασε το 10%. Τονίζεται και πάλι η σχέση δοσο- και χρόνο- εξάρτησης, που έχει παρατηρηθεί για τα περισσότερα βότανα μέχρι τώρα, με εξαίρεση τη μικρή συγκέντρωση (40μg/μL) όπου φαίνεται να υπάρχει θετική συσχέτιση ανάμεσα στο χρόνο επώασης και την ικανότητα πολλαπλασιασμού. Το αφέψημα του Φασκόμηλου παρουσιάζει την ικανότητα να μειώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε πάρα πολύ χαμηλά επίπεδα. Η αρνητική συσχέτιση του χρόνου επώασης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων είναι εμφανής, ενώ η δοσοεξάρτηση φαίνεται μόνο στις 24h επώασης. Η μεγαλύτερη αναστολή παρατηρείται και πάλι μετά από 72h επώασης η οποία υπολογίστηκε πάνω από 90% και στις τρεις συγκεντρώσεις. Αναφορικά με τη δράση που παρουσιάζει το αφέψημα από το Φλισκούνη, για ακόμα μια φορά παρατηρείται χρονοεξαρτώμενη σχέση στην αναστολή του πολλαπλασιασμού, μόνο στις μεγάλες συγκεντρώσεις, ενώ αντίθετα η συγκέντρωση 40μg/μL φαίνεται να έχει θετική συσχέτιση με το χρόνο επώασης. Επιπρόσθετα, η σχέση δοσοεξάρτησης παρατηρείται μόνο συγκρίνοντας τη μικρή δόση με τις δύο μεγάλες, αφού βρέθηκε ότι η αναστολή του πολλαπλασιασμού ήταν σε παρόμοια επίπεδα για τις δύο τελευταίες σε όλους τους χρόνους επώασης. Τέλος, και το αφέψημα από Χαμομήλι εμφανίζει δραστηριότητα στην αναστολή του πολλαπλασιασμού. Παρατηρήθηκε επίσης σχέση δοσοεξάρτησης και στους τρεις χρόνους που μελετήθηκαν, ενώ θετική συσχέτιση με το χρόνο επώασης βρέθηκε μόνο για τις μεγάλες συγκεντρώσεις. Μελετώντας συνολικά τα αποτελέσματα, τα ροφήματα των βοτάνων κατατάσσονται κατά σειρά αυξανόμενης δραστηριότητας ως προς την δυνατότητα να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HT29 ως εξής: Χαμομήλι < Μαντζουράνα < Σπαθόχορτο < Ρίγανη < Φλισκούνη < Φασκόμηλο < Τσάι Βουνού < Αντωνιάδα < Θρύμπα < Θυμάρι < Δενδρολίβανο < Δίκταμο.

Στο Σχήμα 3.4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη μελέτη της επίδρασης των βοτάνων στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των PC3.





Σχήμα 3.4 Επίδραση των αφεψημάτων των 12 βοτάνων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των PC3. Ο (*) στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δε χορηγήθηκε κανένα αφέψημα και θεωρήθηκαν ότι είχαν 100% πολλαπλασιασμό, και εκείνων που επωάστηκαν με τα αφεψήματα των βοτάνων, για 24, 48 και 72h, σε συγκεντρώσεις 200, 120 και 40μg/mL. Οι τιμές είναι ο μ.ο.±S.D. δυο πειραμάτων

Στο Σχήμα 3.4 παρουσιάζονται η επίδραση των αφεψημάτων, διαφορετικών συγκεντρώσεων (40, 120, 200μg/mL), στα PC3 μετά από επώαση για 24, 48 και 72h και τα οποία, εκφράζουν την % ικανότητα των κυττάρων να πολλαπλασιάζονται, σε σχέση με το control, του οποίου η ικανότητα πολλαπλασιασμού λαμβάνεται ως 100%. Όπως για τα HT29, η ανάλυση των αποτελεσμάτων θα γίνει για κάθε αφέψημα χωριστά, ενώ στο τέλος θα γίνει και μια σύγκριση της δραστηριότητας των βοτάνων με βάση την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Το αφέψημα της Αντωνιάδας φαίνεται να είναι δραστικό, μειώνοντας τον πολλαπλασιασμό των PC3. Συγκεκριμένα, επίδραση με συγκέντρωση αφεψήματος 200μg/mL και 40μg/mL προκάλεσε μείωση περίπου 50% μετά από 24h, ενώ η αύξηση μετά από επίδραση 120μg/mL στον ίδιο χρόνο δε βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντική και δεν αναλύεται περαιτέρω. Επιπλέον, φαίνεται να υπάρχει και σε αυτή την κυτταρική σειρά θετική συσχέτιση της αναστολής του πολλαπλασιασμού με το χρόνο επώασης και τη δόση που χορηγήθηκε. Σημαντικό είναι να τονισθεί ότι παρατηρήθηκε μείωση μεγαλύτερη του 95% για τη συγκέντρωση 200μg/mL στις 72h, γεγονός που δηλώνει τη μεγάλη δραστηριότητα που εμφανίζει

το συγκεκριμένο αφέψημα. Το αφέψημα του Δενδρολίβανου επηρεάζει επίσης τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, με την μείωση να υπολογίζεται περίπου στο 40% για τις συγκεντρώσεις 200μg/μL και 40μg/μL στις 24h. Η ανασταλτική του δράση φαίνεται και στις 48h επώασης, με τη μείωση να είναι > 90% για τη μεγάλη δόση, ενώ για τις άλλες δυο υπολογίζεται περίπου στο 60%. Η ικανότητα του να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό φαίνεται και στις 72h επώασης, σε μικρότερο όμως βαθμό, ενώ μόνο σε αυτό το χρόνο παρατηρείται για όλες τις δόσεις θετική συσχέτιση με την % αναστολή. Συνεχίζοντας, το αφέψημα από Δίκταμο φαίνεται να είναι επίσης πολύ δραστικό, αφού η μείωση του πολλαπλασιασμού βρέθηκε να είναι περίπου 80% στις 24h και 90% στις 48 και 72h επώασης σε όλες τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν. Αναφορικά με το αφέψημα από Θρύμπα, φαίνεται καθαρά ότι υπάρχει χρονοεξαρτώμενη αναστολή του πολλαπλασιασμού. Η αναστολή ήταν αρκετά μεγάλη για όλες τις δόσεις που μελετήθηκαν, αφού η ικανότητα των κυττάρων να πολλαπλασιάζονται ήταν κάτω του 10% μετά από 72h επώασης. Το Θυμάρι δεν βρέθηκε να προκαλεί στατιστικά σημαντική μείωση του πολλαπλασιασμού στις 24h, ωστόσο φάνηκε να είναι αρκετά δραστικό μετά από 48 και 72h κυρίως σε συγκέντρωση 200μg/μL. Από τη μελέτη του αφεψήματος της Μαντζουράνας βρέθηκε ότι είναι πολύ δραστικό στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων του προστάτη ήδη από τις 24h, ενώ η δράση αυτή διατηρείται με χρονοεξαρτώμενη σχέση μέχρι και τις 72h. Όσον αφορά τις δόσεις που εξετάστηκαν, και στις τρεις βρέθηκε αξιόλογη μείωση που ήταν ανάλογη της συγκέντρωσης. Η ικανότητα του αφεψήματος της Ρίγανης φαίνεται να εξαρτάται πάρα πολύ από τη δόση που χορηγήθηκε, αλλά και από το χρόνο επώασης, ωστόσο η μείωση που παρατηρήθηκε στις 72h (95 και 85% αντίστοιχα) στις δυο μεγάλες συγκεντρώσεις ήταν μικρότερη από αυτή στις 48h (98 και 95% αντίστοιχα). Τέλος, σχετικά με τη συγκέντρωση 40μg/μL, στατιστικά σημαντική μείωση βρέθηκε μόνο στις 72h και ήταν της τάξης του 40%. Το αφέψημα του Σπαθόχορτου κατάφερε να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό μέχρι 20%, κάτι που παρατηρήθηκε μετά από επώαση με 200μg/μL για 72h, ενώ η μικρή συγκέντρωση μόλις 20% στις ίδιες ώρες επώασης. Φαίνεται και σε αυτή την περίπτωση να υπάρχει θετική συσχέτιση της αναστολής του πολλαπλασιασμού με το χρόνο επώασης αλλά και τη δόση που χορηγήθηκε, κάτι που γίνεται ιδιαίτερα εμφανές από τις 24h. Τα αποτελέσματα από την επίδραση του αφεψήματος που προέρχεται από το Τσάι Βουνού είναι στατιστικά σημαντικά μόνο για τη μεγάλη συγκέντρωση στις 48h, όταν η αναστολή υπολογίζεται περίπου ίση με 30% και στις δυο ακραίες συγκεντρώσεις στις 72h (61% για τα 200μg/μL και 30% για τα 40μg/μL), φαίνεται ωστόσο το αφέψημα να δρα με δοσο- και χρονο- εξαρτώμενο τρόπο. Συνεχίζοντας, το αφέψημα του Φασκόμηλου αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ακόμα και στις 24h επώασης, ωστόσο η μόνη μείωση που βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντική ήταν για τη συγκέντρωση 200μg/μL και υπολογίστηκε στο 57%. Αντίθετα, η μείωση βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντική στις 48

και 72h επώσης σε όλες τις συγκεντρώσεις, ενώ το αφέψημα δρα με δοσο- και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο. Η μεγαλύτερη μείωση σημειώνεται στις 72h μετά από επίδραση με 200μg/μL αφεψημάτος (97%). Αναφορικά με το αφέψημα από Φλισκούνη, υπάρχει ξεκάθαρα θετική συσχέτιση μεταξύ της αναστολής του πολλαπλασιασμού του χρόνου επώσης, καθώς και με τη δόση που χορηγήθηκε. Η μείωση αυτή κυμάνθηκε μεταξύ 83-96% για τη μεγάλη συγκέντρωση, μεταξύ 68-99% για τη μεσαία συγκέντρωση και μεταξύ 27-79% για τη μικρή. Το τελευταίο βότανο της μελέτης ήταν το Χαμομήλι, το αφέψημα του οποίου δε φάνηκε να είναι αρκετά δραστικό στην αναστολή του πολλαπλασιασμού, με την % μείωση να είναι στατιστικά σημαντική μόνο στις 48h μετά από επίδραση με 200μg/μL (15%), και στις 72h όπου βρέθηκε 40% για 200μg/μL και 45% για 40μg/μL. Μελετώντας συνολικά τα αποτελέσματα, τα ροφήματα των βοτάνων κατατάσσονται κατά σειρά αυξανόμενης δραστηριότητας ως προς την δυνατότητα να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων PC3 ως εξής: Χαμομήλι < Τσάι Βουνού < Θυμάρι < Σπαθόχορτο < Δενδρολίβανο < Αντωνιάδα < Ρίγανη < Φασκόμηλο < Φλισκούνη < Μαντζουράνα < Θρύμπα < Δίκταμο.

Παρατηρώντας την κατάταξη της δραστηριότητας των αφεψημάτων των βοτάνων και στις δυο κυτταρικές σειρές, φαίνεται ότι υπάρχουν κάποιες ομοιότητες, αλλά και πάρα πολλές διαφορές. Συγκριμένα και στις δυο κυτταρικές σειρές το πιο δραστικό αφέψημα για την αναστολή του πολλαπλασιασμού βρέθηκε να είναι αυτό του Δίκταμου, ενώ αυτό που έδειξε τη μικρότερη δράση ήταν αυτό από το Χαμομήλι. Από τις σημαντικότερες διαφορές που παρατηρήθηκαν ήταν για το αφέψημα της Μαντζουράνας, το οποίο φάνηκε πολύ δραστικό και κατατάχθηκε τρίτο, όσον αφορά την αναστολή του πολλαπλασιασμού των PC3, ενώ μόλις ενδέκατο στα HT29. Επίσης, το αφέψημα του Δενδρολίβανου ενώ φάνηκε πολύ δραστικό στα HT29, παρουσίασε σχετικά χαμηλή δραστηριότητα στα PC3. Επιπρόσθετα, το αφέψημα από Θυμάρι βρίσκεται στις τελευταίες θέσεις σχετικά με την ικανότητα του να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των PC3, σε αντίθεση με την αναστολή του πολλαπλασιασμού των HT29 όπου βρίσκεται στην Τρίτη θέση.

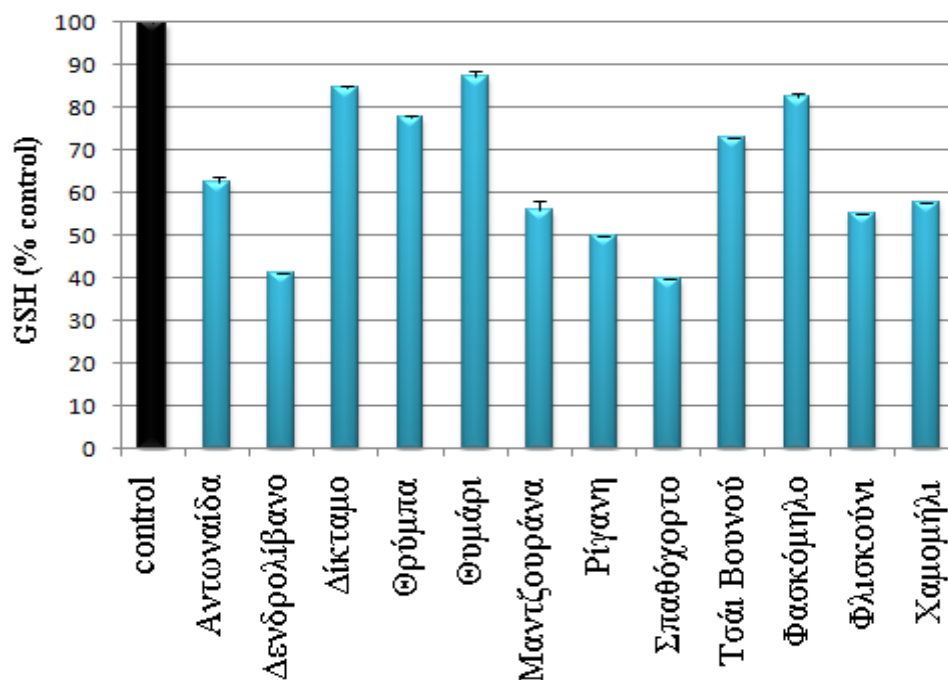
Η αναστολή του πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων έχει επισημανθεί σε πολλές έρευνες που έχουν γίνει τόσο σε βότανα, όσο και σε επιμέρους συστατικά τους, ενισχύοντας τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, ωστόσο, ο ακριβής τρόπος με τον οποίο δρουν δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος. Η καρνασόλη, συστατικό που απαντάται σε μεγάλες ποσότητες στη Ρίγανη, στο Δίκταμο και στο Θυμάρι, σε συγκέντρωση 100μM, μπορεί να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων του στήθους κατά 50% μετά από επώση 48h, επάγοντας την απόπτωση (Agunasree, 2010). Σε μια πρόσφατη έρευνα βρέθηκε ότι η ρεσβερατρόλη και η χρυσίνη μπορούν να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό των Caco-2 μετά

από 72h επώασης όταν χορηγήθηκαν συνδυαστικά σε συγκεντρώσεις 20μM και 32μM, αντίστοιχα (Iwuchukwu *et al.*, 2011). Η δράση της ρεσβερατρόλης, να αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, έχει αναφερθεί και στο παρελθόν και έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με την παραμονή του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις S και G2/M μέσω της αναστολής των Cdk7 και p34Cdc2 (Joe *et al.*, 2002, Pozo-Cuisado *et al.*, 2002, Estrov *et al.*, 2003, Liang *et al.*, 2003). Συνεχίζοντας, το αιθέριο έλαιο του Δενδρολίβανου, βρέθηκε αποτελεσματικό στην κατά 50% αναστολή του πολλαπλασιασμού, καρκινικών κυττάρων του μαστού και του προστάτη, μετά από επώαση 24h σε συγκεντρώσεις 190 και 180μg/mL, αντίστοιχα (Hussain *et al.*, 2010). Παρόμοια αποτελέσματα με την παρούσα μελέτη, ανέφεραν οι Jin και συνεργάτες (2010) σχετικά με δράση των ολικών πολυφαινόλων από Τσάι σε κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου (HT29, LoVo, SW480, HCT116). Η ικανότητα αναστολής του πολλαπλασιασμού των συστατικών αυτών, βρέθηκε να έχει θετική συσχέτιση με το χρόνο επώασης (24h-1w) και τη δόση που χορηγήθηκε (50-300μg), η οποία κυμάνθηκε έως και 90%. Ο τρόπος με τον οποίο οι πολυφαινόλες από Τσάι αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό έχει διαλευκανθεί. Συγκεκριμένα, ο EGCG περιορίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω αναστολής ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις της αντιγραφής του DNA, ενώ σχηματίζει και εστερικούς δεσμούς με το πρωτεόσωμα αναστέλλοντας το, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση της p27KIP1. Έτσι τα κύτταρα παραμένουν στη φάση G1 του κύκλου ανάπτυξης. Επιπρόσθετα, ο EGCG επάγει τον αναστολέα κινάσης της κυκλίνης WAF1/p21 με αποτέλεσμα τα κύτταρα να παραμένουν στη φάση G0/G1 (Adhami *et al.*, 2003, Syed *et al.*, 2007). Επίσης, από μια πρόσφατη μελέτη βρέθηκε ότι η γενιστεΐνη αναστέλλει ικανοποιητικά τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων του προστάτη, μετά από επώαση 72h σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (5μg/mL, 10μg/mL, 20μg/mL) (Paternac *et al.*, 2008).

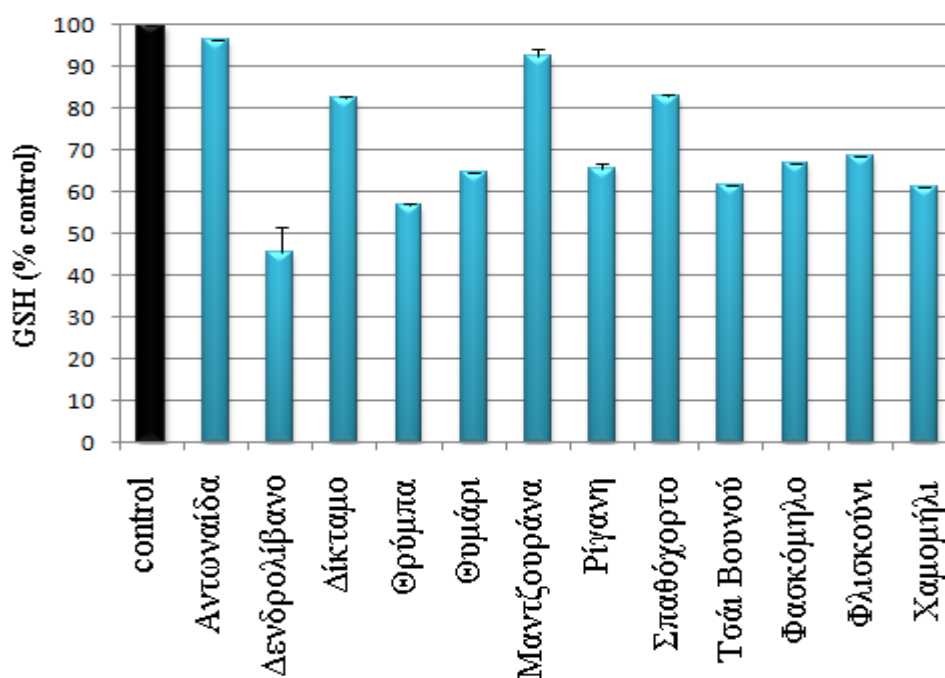
3.5 Μελέτη της επίδρασης των αφεψημάτων των βοτάνων στα επίπεδα της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης (GSH) στις κυτταρικές σειρές HT29 και PC3

Η GSH είναι μια μη πρωτεϊνική θειόλη που αποτελεί το κύριο ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό συστατικό του οργανισμού (Powolny & Singh, 2008). Η *de novo* σύνθεσή της είναι αποτέλεσμα της συνεχούς δράσης δυο ATP-εξαρτώμενων ενζύμων, της γ-GCL και της συνθάσης της γλουταθειόνης, που καθορίζουν έτσι την ενδοκυττάρια συγκέντρωσή της (Meister & Anderson, 1983). Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η γ-GCL είναι μια ετεροδιμερής πρωτεΐνη που αποτελείται από μία ρυθμιστική και μια καταλυτική υπομονάδα (Sierra-Rivera *et al.*, 1994), η έκφραση των οποίων βρίσκεται κάτω από τη ρύθμιση του NF-κB. Αυτό συνεπάγεται ότι η αυξημένη ενεργοποίηση αυτού του μεταγραφικού παράγοντα οδηγεί και σε αύξηση της

ενδοκυττάριας GSH, μέσω αύξησης της σύνθεσης και της δραστικότητας της γ -GCL (Meng *et al.*, 2010). Στα Σχήματα 3.5 και 3.6 παρουσιάζονται τα επίπεδα της ενδοκυττάριας GSH ύστερα από επίδραση με τα αφεψημάτα των βοτάνων για 24h στις κυτταρικές σειρές HT29 και PC3, αντίστοιχα.



Σχήμα 3.5 Επίδραση των αφεψημάτων των βοτάνων στα επίπεδα της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης στα HT29. Οι τιμές είναι μ.ο.±S.D. δύο πειραμάτων



Σχήμα 3.6 Επίδραση των αφεψημάτων των βοτάνων στα επίπεδα της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης στα PC3. Οι τιμές είναι μ.ο.±S.D. δύο πειραμάτων

Τα επίπεδα της ενδοκυττάριας GSH (εκφρασμένα ως % του control) μειώθηκαν, μετά από επίδραση με τα αφεψήματα των βοτάνων τελικής συγκέντρωσης 40μg/mL για 24h. Ωστόσο η μείωση αυτή δε βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντική. Μια πρώτη παρατήρηση από τα Σχήματα 3.5 και 3.6 τα αφεψήματα των βοτάνων φαίνεται να επηρεάζουν περισσότερο τα επίπεδα της GSH στα HT29. Το Δενδρολίβανο είναι το βότανο που έδειξε την μεγαλύτερη επίδραση μειώνοντας τα επίπεδα της GSH περίπου κατά 50% και στις δυο κυτταρικές σειρές, κάτι που παρατηρήθηκε και για το Σπαθόχορτο μόνο στα HT29. Επιπρόσθετα, η Αντωναΐδα, η Μαντζουράνα, η Ρίγανη, το Φλισκούνη και το Χαμομήλι μείωσαν τη GSH αρκετά σε σχέση με το control στα κύτταρα HT29, ενώ τα βότανα που επηρεάζουν λιγότερο την ενδοκυττάρια συγκέντρωσή της σε αυτή την κυτταρική σειρά ήταν το Δίκταμο, η Θρύμπα, το Θυμάρι, το Τσάι Βουνού και το Φασκόμηλο. Αξίζει να σημειωθεί ότι η Αντωναΐδα, το Δίκταμο, η Μαντζουράνα και το Σπαθόχορτο επηρεάζουν ελάχιστα ή σχεδόν καθόλου τα επίπεδα της GSH στα PC3, κάτι που επισημαίνει το διαφορετικό τρόπο που μπορεί να δρουν τα αφεψήματα σε διαφορετικού είδους κυτταρικές σειρές. Επιπλέον, η Θρύμπα, το Θυμάρι, η Ρίγανη, το Τσάι Βουνού, το Φασκόμηλο, το Φλισκούνη και το Χαμομήλι φάνηκε να μειώνουν τη συγκέντρωση της GSH στα PC3 περίπου σε παρόμοια επίπεδα.

Η ενδοκυττάρια GSH έχει βρεθεί ότι είναι σημαντικό μόριο για τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης. Πρόκειται για μόριο με κυρίαρχο ρόλο, καθώς πολλά από τα σηματοδοτικά μόρια ενεργοποιούνται με βάση την οξειδοαναγωγική κατάσταση της είτε άμεσα είτε έμμεσα, αλληλεπιδρώντας με τις ελεύθερες ρίζες, όπως η AP-1, η AP-2, η πρωτεϊνική κίνηση C, η κίνηση της τυροσίνης κ.α. (Balendiran *et al.*, 2004). Οι πρωτεΐνες αυτές εμπλέκονται σε ποικίλα κυτταρικά μονοπάτια, όπως τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική διαφοροποίηση και τη μορφογένεση. Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί ότι τα επίπεδα της ενδοκυττάριας GSH είναι ιδιαίτερα αυξημένα στα καρκινικά κύτταρα, σε σχέση με τα φυσιολογικά, πιθανότατα ως απάντηση στους αυξημένους μεταβολικούς ρυθμούς που παρατηρούνται στα κύτταρα αυτά, διατηρώντας έτσι σε ένα σχετικά σταθερό επίπεδο τις ROS (Batist *et al.*, 1996). Συνεπώς, ουσίες που μπορούν να μειώσουν τα επίπεδα της GSH θα μπορούσαν κατ' επέκταση να αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και να επάγουν την απόπτωση.

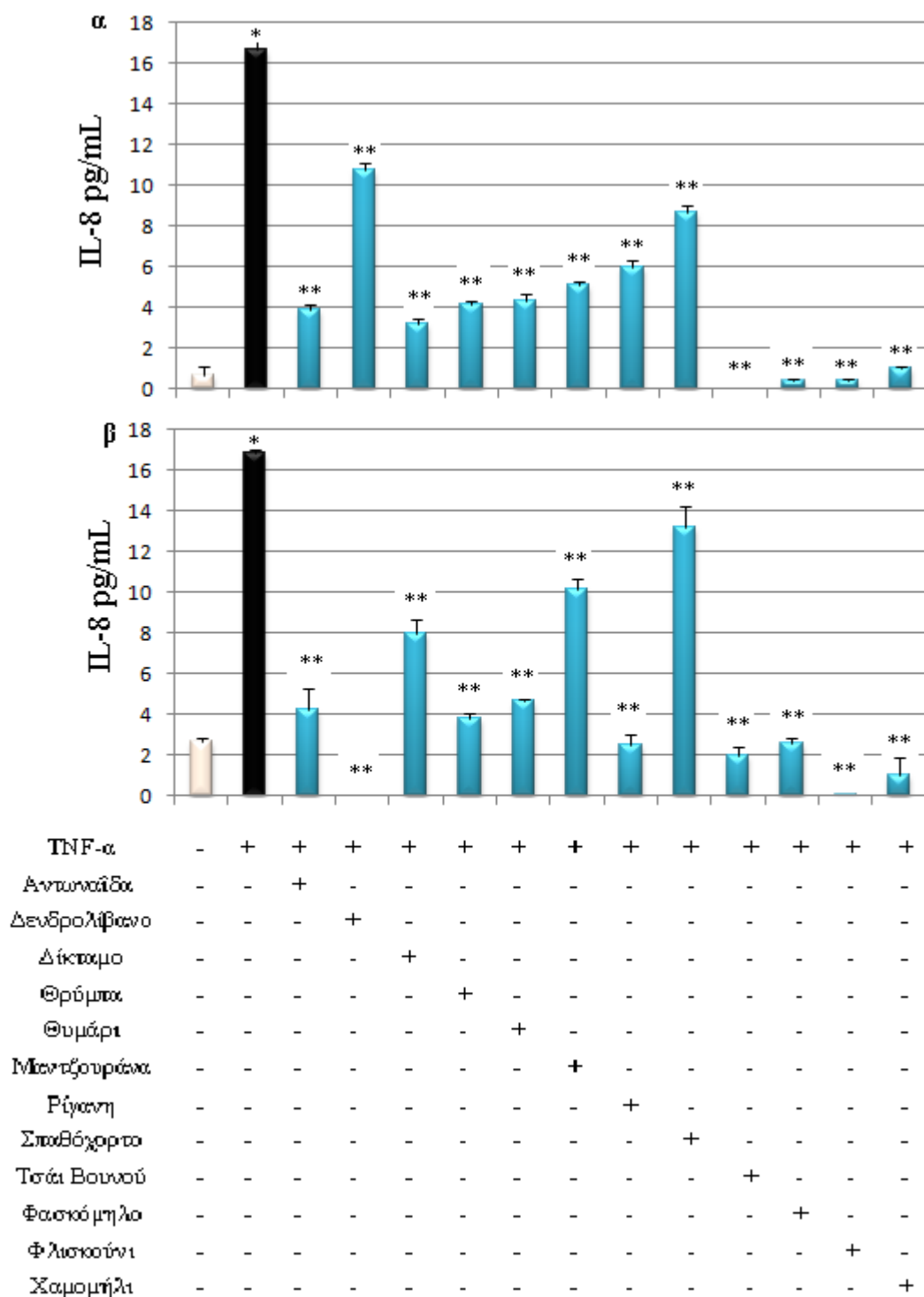
Ελάχιστες είναι οι βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με την ικανότητα των βοτάνων να μειώνουν τη συγκέντρωση της GSH και επικεντρώνονται κυρίως στα επιμέρους συστατικά τους. Συγκριτικά με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, οι Gauliard και συνεργάτες (2008), μελετώντας την επίδραση της ρεσβερατρόλης και της κερκετίνης στα επίπεδα της GSH, δε βρήκαν καμία στατιστικά σημαντική μείωση σε καρκινικά κύτταρα του ήπατος. Αντίθετα, σε

μια πρόσφατη μελέτη βρέθηκε ότι το αιθέριο έλαιο από ένα βότανο (*L. Lucidus*) της οικογένειας Lamiaceae μπορεί να μειώσει σημαντικά τα επίπεδα της ενδοκυττάριας GSH σε καρκινικά κύτταρα του ήπατος (Yo *et al.*, 2011). Σε μια άλλη μελέτη βρέθηκε ότι ένα συνθετικό παράγωγο, που προέρχεται από το *Cinnamomum cassia*, σε συγκέντρωση 20μM μείωσε την συγκέντρωση της ενδοκυττάριας GSH ύστερα από επώαση 6h (Ock *et al.*, 2011). Τέλος, οι Kachadourian και Day (2006) μελέτησαν την ικανότητα κάποιων πολυφαινόλων να μειώνουν τη συγκέντρωση της GSH σε λευχαιμικά κύτταρα (HL-60), καθώς και σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη (PC3) και των πνευμόνων (A549). Οι πολυφαινόλες που μελετήθηκαν ήταν η χρυσίνη, η απιγενίνη, η καμπερόλη, η κερκετίνη και η γενιστεΐνη. Με βάση τα αποτελέσματα, οι ενώσεις αυτές μείωσαν σε σημαντικό επίπεδο τη συγκέντρωση της GSH, μετά από 24h επώασης, σε όλες τις καρκινικές σειρές που μελετήθηκαν, ενώ τα πιο σημαντικά από αυτά δείχνουν ότι 25μM απιγενίνης μειώνουν την ενδοκυττάρια GSH κατά 67% (αναφορικά με το control) στα PC3, 50μM χρυσίνης κατά 60% στα HL-60, ενώ 25μM χρυσίνης περισσότερο από 95% στα A549.

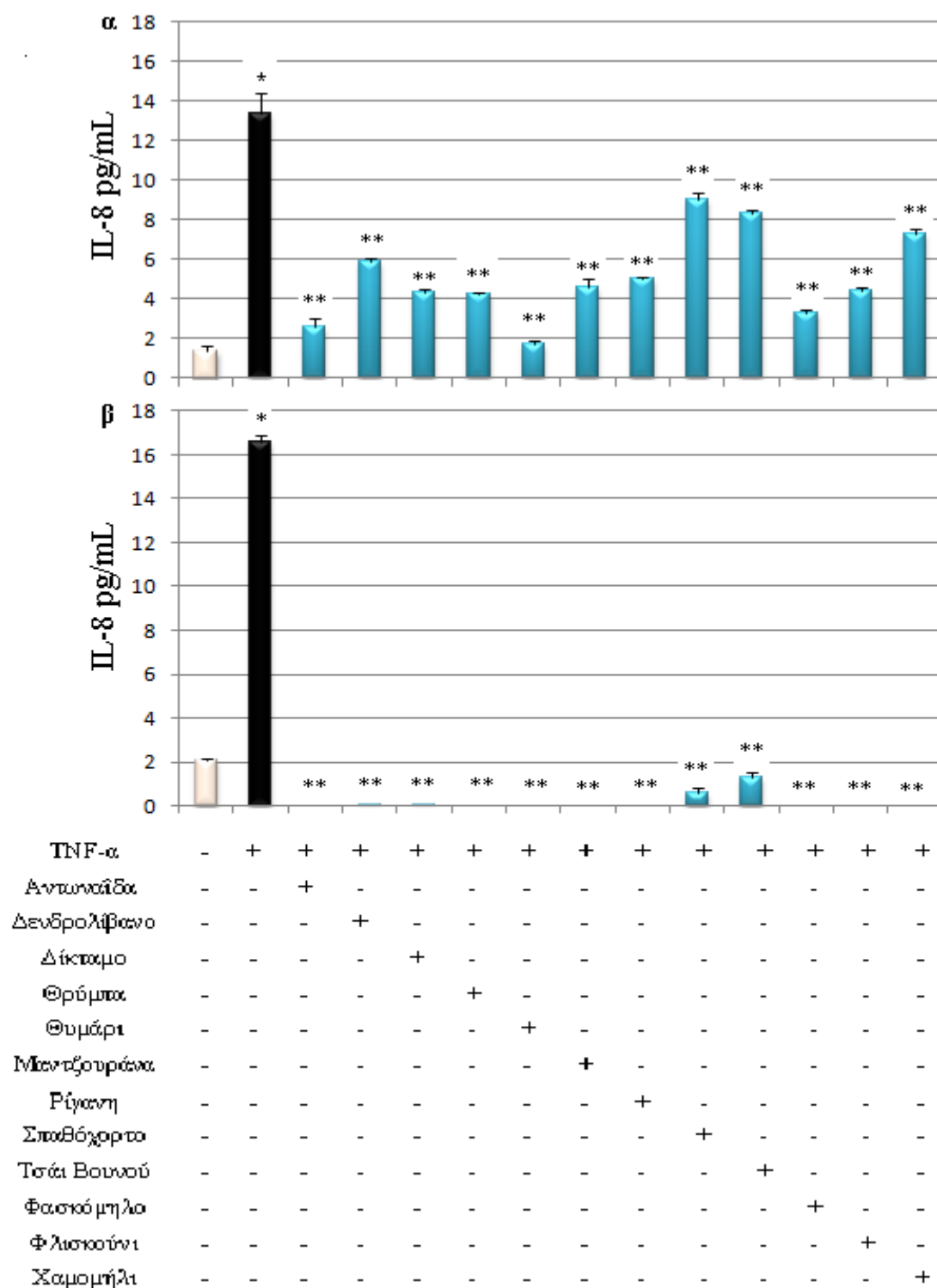
3.6 Μελέτη της επίδρασης των αφεψημάτων των βοτάνων στα επίπεδα της ιντερλευκίνης-8 (IL-8) στις κυτταρικές σειρές HT29 και PC3

Η IL-8 είναι μια πρωτεΐνη, μικρού μοριακού βάρους (8-kDA), που ανήκει στις κυτταροκίνες (στην οικογένεια ELR+CXC) (Hirsch *et al.*, 2011). Πρόκειται για μια προφλεγμονώδη κυτταροκίνη, της οποίας τα επίπεδα έκφρασης αυξάνονται σε πολλούς τύπους καρκίνου. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση και στην εξέλιξη του όγκου, ενώ θεωρείται ότι έχει χημειοτακτική δράση για τα πολυμορφοπύρρηνα (Vandercappellen *et al.*, 2008). Όπως όλες οι χημειοκίνες, η IL-8 αναγνωρίζει και συνδέεται σε υποδοχείς συζευγμένους με G-πρωτεΐνες, συγκεκριμένα για αυτή την πρωτεΐνη είναι οι CXCR1 και 2 (Heidemann *et al.*, 2003). Τα επίπεδα της πρωτεΐνης αυτής μεταβάλλονται σε καταστάσεις χρόνιας φλεγμονής και οξειδωτικού στρες, καταστάσεις που σχετίζονται με τον καρκίνο. Συγκεκριμένα τα καρκινικά κύτταρα παράγουν την IL-8 ως αυτοκρινή παράγοντα ανάπτυξης, που προάγει την ανάπτυξη του όγκου και τη μεταστατική διαδικασία (Xie, 2001). Ωστόσο, εκτός από τα καρκινικά και άλλα κύτταρα εκκρίνουν την IL-8, όπως τα μονοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα, τα επιθηλιακά και τα μεσοθηλιακά.

Τα επιθηλιακά του κύτταρα του προστάτη σε φυσιολογικές συνθήκες δεν εκφράζουν την IL-8 σε μεγάλη ποσότητα. Ωστόσο, έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα αυτού του πρωτεϊνικού μορίου αυξάνονται, κατά πολύ, στον καρκίνο (Lu *et al.*, 2007, Begley *et al.*, 2008, Seaton *et al.*, 2008). Αυτό είναι αποτέλεσμα της αυξημένης ενεργοποίησης του NF-κB και συσχετίζεται με την αυξημένη προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων του προστάτη στο ενδοθήλιο (Engl *et al.*, 2006). Παρόμοιες διαδικασίες συμβαίνουν και στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Με βάση τα παραπάνω, η IL-8 είναι ένα μόριο στόχος για την αντιμετώπιση του καρκίνου και ουσίες που μπορούν να επηρεάσουν τα επίπεδά της μπορούν να δράσουν προστατευτικά (Hirsch *et al.*, 2011). Στα Σχήματα που ακολουθούν (3.7 και 3.8) παρουσιάζονται τα επίπεδα της IL-8 ύστερα από επίδραση με τα αφεψήματα των βοτάνων για 24h και 48h στις κυτταρικές σειρές HT29 και PC3, αντίστοιχα.



Σχήμα 3.7 Επίδραση αφεψημάτων στα επίπεδα της IL-8 στην κυτταρική σειρά HT29, α) για 24h και β) για 48h. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,0001$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία είχε επιδράσει ο TNF-α και εκείνων του control, ενώ ο (**) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,0001$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία είχε επιδράσει ο TNF-α και εκείνων στα οποία είχαν επιδράσει και τα αφεψήματα των βοτάνων. Οι τιμές είναι ο μ.ο.±S.D. δυο πειραμάτων



Σχήμα 3.8 Επίδραση αφεψημάτων στα επίπεδα της IL-8 στην κυτταρική σειρά PC3, α) για 24h και β) για 48h. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,0001$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία είχε επιδράσει ο TNF-α και εκείνων του control, ενώ ο (**) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,0001$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία είχε επιδράσει ο TNF-α και εκείνων στα οποία είχαν επιδράσει και τα αφεψήματα των βοτάνων. Οι τιμές είναι ο μ.ο.±S.D. δυο πειραμάτων

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω διαγράμματα, τα HT29 καθώς και τα PC3 εκκρίνουν την IL-8. Για να αυξηθούν τα επίπεδα έκκρισής της, έγινε διέγερση των κυττάρων με TNF-α (μοντέλο φλεγμονής). Η επαγωγή των κυττάρων με TNF-α οδηγεί σε αύξηση της εκκρινόμενης

IL-8, μέσω αύξησης της έκφρασης του γονιδίου της (Konig *et al.*, 2004, Kim *et al.*, 2009). Μετά από την επίδραση με τα αφεψημάτα βοτάνων παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση στα επίπεδα της IL-8 τόσο στα HT29 όσο και στα PC3. Για την καλύτερη κατανόηση των αποτελεσμάτων παρατίθεται ο Πίνακας 3.6 που παρουσιάζεται η % μείωση της συγκέντρωσης της στους δυο χρόνους που μετρήθηκαν.

Πίνακας 3.6 % Μείωση της συγκέντρωσης της IL-8 μετά από την επίδραση με τα αφεψημάτα των βοτάνων επί 24 και 48h στις κυτταρικές σειρές HT29 και PC3, $p < 0,005$

Βότανα	% Μείωση			
	HT29		PC3	
	24h	48h	24h	48h
Αντωνιάδα	76	75	81	100
Δενδρολίβανο	35	100	56	100
Δίκταμο	81	53	68	100
Θρύμπα	75	77	68	100
Θυμάρι	74	72	87	100
Μαντζουράνα	70	40	66	100
Ρίγανη	64	85	63	100
Σπαθόχορτο	48	21	33	96
Τσάι Βουνού	100	88	38	92
Φασκόμηλο	97	85	76	100
Φλισκούνη	97	100	67	100
Χαμομήλι	94	94	45	100

Σημειώνεται ότι οι συγκεντρώσεις της IL-8 που ήταν κάτω από τα όρια ανίχνευσης ($< 1,5 \text{ pg/mL}$), της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της, παρουσιάζονται ως μηδενικές και κατά συνέπεια η % μείωση ως 100%.

Εξετάζοντας τη δυνατότητα των αφεψημάτων των βοτάνων να μειώνουν την έκφραση της IL-8 μετά από επώαση για 24h στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη, η μεγαλύτερη μείωση παρατηρείται για την Αντωνιάδα και το Θυμάρι όπου η συγκέντρωση της βρέθηκε ίση με $2,56 \pm 0,51$ και $1,73 \pm 0,16 \text{ pg/mL}$, αντίστοιχα, ενώ η μικρότερη για το Σπαθόχορτο και το Χαμομήλι ($9,04 \pm 0,3$ και $7,32 \pm 0,25 \text{ pg/mL}$, αντίστοιχα). Τα υπόλοιπα βότανα παρουσίασαν μείωση της IL-8 μεγαλύτερη από 66%, με εξαίρεση το Δενδρολίβανο και τη Ρίγανη που την μείωσαν κατά 56% και 63%, αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, τα αφεψημάτα των βοτάνων είναι πολύ δραστικά στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη, καθώς βρέθηκε ότι μειώνουν την συγκέντρωση της IL-8 κάτω από τα ανιχνεύσιμα επίπεδα, μετά από επώαση για 48h. Ένα μέρος αυτής της δράσης θα μπορούσε να αποδοθεί στην αναστολή του πολλαπλασιασμού, καθώς είναι λογικό μικρότερος αριθμός κυττάρων να παράγει μικρότερη ποσότητα πρωτεΐνης. Παρόλο αυτά τα επίπεδα της μείωσης δε μπορούν να εξηγηθούν μόνο βάσει της αναστολής του

πολλαπλασιασμού, γεγονός που υποδηλώνει ότι υπάρχει αρνητική συσχέτιση μεταξύ του χρόνου επίδρασης των εκχυλισμάτων και της IL-8 που εκκρίνεται.

Όσον αφορά την επίδραση των αφεψημάτων στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου, τα αποτελέσματα είναι σημαντικά, θα πρέπει όμως και πάλι να τονισθεί η διαφορετική επίδραση που έχουν τα αφεψήματα των βοτάνων στα κύτταρα διαφορετικών τύπων καρκίνου. Συγκεκριμένα, τα βότανα φαίνεται να επιδρούν περισσότερο στην έκκριση της IL-8 στα κύτταρα του προστάτη. Για τα HT29, τη μικρότερη επίδραση βρέθηκε να έχει το Δενδρολίβανο, καθώς προκαλεί 35% μείωση της συγκέντρωσης της IL-8 μετά από 24h επώασης, ενώ τη μεγαλύτερη το Φασκόμηλο, το Φλισκούνη και το Χαμομήλι. Αρνητική συσχέτιση μεταξύ του χρόνου επίδρασης των αφεψημάτων και της εκκρινόμενης IL-8 παρατηρήθηκε και σε αυτή την κυτταρική σειρά, όμως μόνο για το Δενδρολίβανο και τη Ρίγανη. Συγκεκριμένα το Δενδρολίβανο, ενώ στις 24h βρέθηκε να έχει τη μικρότερη επίδραση, μετά από επώαση για 48h μείωσε τη συγκέντρωση της IL-8 κάτω από τα ανιχνεύσιμα όρια. Όπως και στην περίπτωση των PC3 κυττάρων ένα μέρος της μείωσης μπορεί να αποδοθεί στην αναστολή του πολλαπλασιασμού. Αντίθετα, μετά από επίδραση διάρκειας 48h με Δίκταμο, Μαντζουράνα, Σπαθόχορτο, Τσάι Βουνού και Φασκόμηλο η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού μορίου αυξάνεται. Τα αποτελέσματα αυτά πιθανά σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, καθώς αύξηση του αριθμού τους συνεπάγεται και αύξηση της IL-8 που εκκρίνεται. Τέλος, η Ανθοναΐδα, η Θρύμπα και το Θυμάρι προκαλούν μείωση στη συγκέντρωση της IL-8 της τάξης περίπου 75% μετά από επώαση για 24h, η οποία παραμένει η ίδια μετά το πέρας των 48h.

Δεν υπάρχουν πολλές βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με την επίδραση των βοτάνων της παρούσας μελέτης στα επίπεδα της IL-8. Από τα συστατικά που έχουν μελετηθεί περισσότερο είναι οι πολυφαινόλες. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι ρεσβερατρόλη μπορεί να αναστείλει *in vitro* την έκφραση της IL-8 σε διεγερμένα με PMA μονοκύτταρα (Shen *et al.*, 2003). Επιπρόσθετα, η ρεσβερατρόλη και η κερκετίνη, βρέθηκαν ότι έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την έκκριση της IL-8 σε διεγερμένα με IL-1 καρκινικά κύτταρα του ήπατος (Gauliard *et al.*, 2008). Η απιγενίνη, μια φλαβόνη, εμφανίζει επίσης την ικανότητα να μειώνει την έκκριση της IL-8 σε διεγερμένα με LPS μονοκύτταρα (Nicholas *et al.*, 2007). Η ικανότητα των πολυφαινολών να αναστέλλουν την έκκριση της IL-8 επιβεβαιώθηκε και σε άλλη μελέτη, στην οποία βρέθηκε ότι το ελλαγικό οξύ, η χρυσίνη, η γενιστεΐνη και ο EGCG μπορούν να μειώσουν σε σημαντικά επίπεδα την έκκριση της IL-8 σε κυτταρική σειρά του καρκίνου του εντέρου (Romier *et al.*, 2008). Επιπρόσθετα, σε μια πρόσφατη μελέτη βρέθηκε ότι οι ελιές, που είναι πλούσιες σε φυτοχημικά –ανάμεσα σε άλλα και πολυφαινόλες-, εμφανίζουν δραστηριότητα στη μείωση της έκφρασης της IL-8, σε καρκινικά κύτταρα του στομάχου (Kountouri *et al.*,

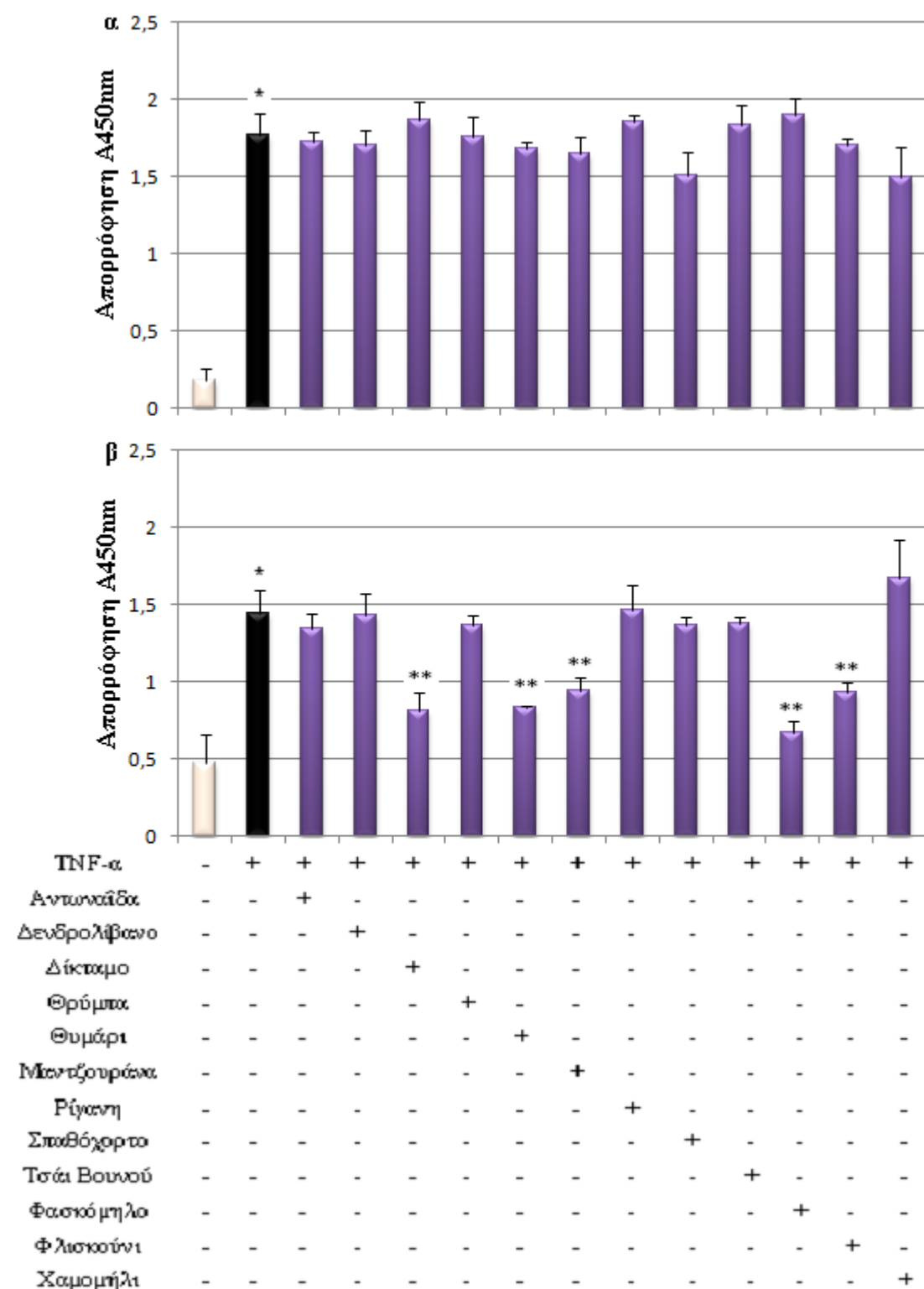
2007). Τέλος, οι Zhou και συνεργάτες (2004), μελετώντας τη δράση της υπερφορίνης, ενός από τα φυτοχημικά που περιέχονται στο Σπαθόχορτο, βρήκαν ότι επάγει την έκφραση του γονιδίου της IL-8 σε κύτταρα του εντερικού επιθηλίου καθώς και σε κύτταρα λευχαιμίας, με μηχανισμό ανεξάρτητο του NF-κΒ. Η έρευνα αυτή μπορεί εν μέρει να αιτιολογήσει τη μειωμένη ικανότητα του Σπαθόχορτου στο να μειώνει την έκκριση της IL-8 και την αύξηση της μετά από 48h, που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη στα HT29.

3.7 Μελέτη της επίδρασης των αφεψημάτων των βοτάνων στα επίπεδα του πυρηνικού παράγοντα-κΒ (NF-κΒ) p65 στις κυτταρικές σειρές HT29 και PC3

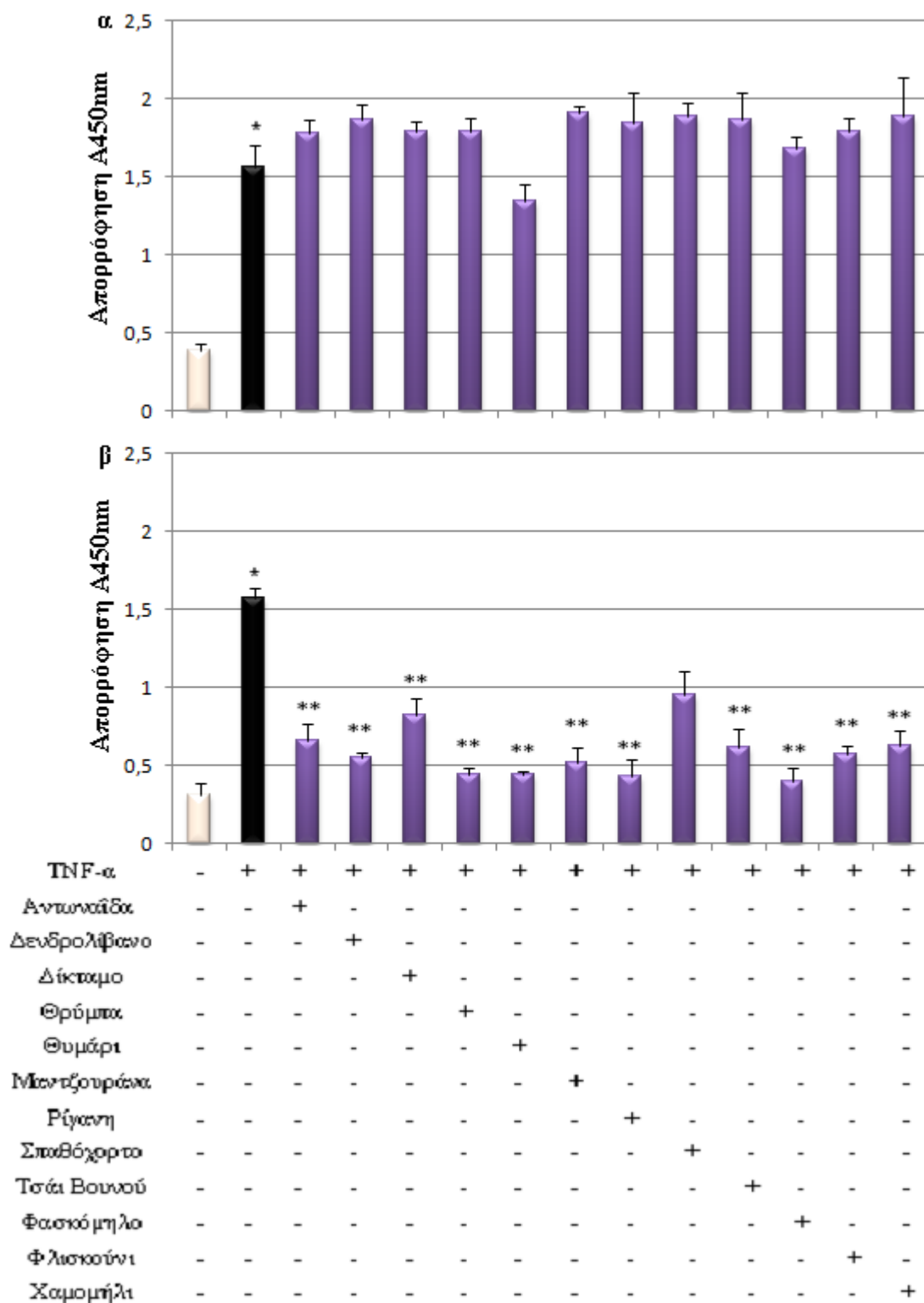
Ο NF-κΒ είναι ένα μεταγραφικό μόριο που εμπλέκεται στην έκφραση πολλών γονιδίων που σχετίζονται με τη φλεγμονή και τον καρκίνο. Απαντάται σε όλα τα κύτταρα στην ανενεργή του μορφή στο κυτταρόπλασμα, ενώ για την ενεργοποίησή του ενοχοποιούνται διάφοροι παράγοντες, όπως ROS, φλεγμονώδεις παράγοντες, κυτταροκίνες, προαγωγείς όγκων, ακτινοβολία γ, ενδοτοξίνες, υπεριώδης ακτινοβολία και οι ακτίνες X (Kumar *et al.*, 2004). Ο τρόπος που αυτοί οι παράγοντες ενεργοποιούν τον NF-κΒ διαφέρει. Για παράδειγμα, ο TNF-α, αφού συνδεθεί στον υποδοχέα του, που εντοπίζεται στη μεμβράνη του κυττάρου, ενεργοποιεί την IKK και με αυτό τον τρόπο και τον NF-κΒ (Aggarwal *et al.*, 2009).

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν στα επίπεδα ενεργοποίησης του NF-κΒ μετά από την επίδραση με τα αφεψήματα των βοτάνων για 24 και 48h στις κυτταρικές σειρές HT29 και PC3 (Σχήματα 3.8 και 3.9). Επιπρόσθετα, στον Πίνακα 3.7 παρουσιάζεται η % μείωση των επιπέδων του NF-κΒ μετά από την επίδραση με τα αφεψήματα των βοτάνων.

Αρχικά, όπως φαίνεται από τα παρακάτω διαγράμματα, η διέγερση των κυττάρων με TNF-α, οδήγησε σε ενεργοποίηση του NF-κΒ, κάτι που ήταν αναμενόμενο, όπως εξηγείται παραπάνω. Αναφορικά με τα αποτελέσματα, παρατηρούμε ότι η μεταβολή που σημειώθηκε μετά από 24h επώασης δε βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντική και για αυτό δε θα αναλυθεί περαιτέρω. Επίσης, για την καλύτερη κατανόηση των αποτελεσμάτων, θα αναλυθεί μόνο η % μείωση που σημειώθηκε μετά την ποιοτική εκτίμηση των επιπέδων του NF-κΒ μετά από 48h επώασης των κυττάρων με τα αφεψήματα των βοτάνων.



Σχήμα 3.9 Επίδραση αφεψημάτων των βοτάνων στα επίπεδα του NF-κB στην κυτταρική σειρά HT29, α) για 24h και β) για 48h. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,0001$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία είχε επιδράσει ο TNF-α και εκείνων του control, ενώ ο (**) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,005$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία είχε επιδράσει ο TNF-α και εκείνων στα οποία είχαν επιδράσει και τα αφεψήματα των βοτάνων. Οι τιμές είναι ο μ.ο.±S.D. δυο πειραμάτων



Σχήμα 3.10 Επίδραση αφεψημάτων των βοτάνων στα επίπεδα του NF-κΒ στην κυτταρική σειρά PC3, α) για 24h και β) για 48h. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,0001$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία είχε επιδράσει ο TNF-α και εκείνων του control, ενώ ο (**) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,005$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία είχε επιδράσει ο TNF-α και εκείνων στα οποία είχαν επιδράσει και τα αφεψήματα των βοτάνων. Οι τιμές είναι ο μ.ο.±S.D. δυο πειραμάτων

Πίνακας 3.7 % Μείωση των επιπέδων του NF-κΒ μετά από την επίδραση με τα αφεψημάτα των βοτάνων για 48h στις κυτταρικές σειρές HT29 και PC3. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0,005$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία είχε επιδράσει ο TNF-α και εκείνων που είχαν επιδράσει και τα αφεψημάτα των βοτάνων

Βότανα	% Μείωση	
	HT29	PC3
Αντωνάϊδα	7	58*
Δενδρολίβανο	0	65*
Δίκταμο	43*	47*
Θρύμπα	5	72*
Θυμάρι	42*	72*
Μαντζουράνα	35*	67*
Ρίγανη	0	73*
Σπαθόχορτο	5	39
Τσάι Βουνού	5	61*
Φασκόμηλο	53*	75*
Φλισκούνι	36*	63*
Χαμομήλι	0	60*

Αναφορικά με την επίδραση των αφεψημάτων στα HT29, μετά από 48h επώασης παρατηρήθηκε ότι 7 από τα 12 βότανα δεν μπορούν να αναστείλουν την ενεργοποίηση του NF-κΒ. Μόνο τα αφεψημάτα από Δίκταμο, Θυμάρι, Μαντζουράνα, Φασκόμηλο και Φλισκούνι προκαλούν στατιστικά σημαντική μείωση στην ενεργοποίηση του NF-κΒ. Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη αναστολή, της τάξης του 53%, παρατηρήθηκε στο αφέψημα από Φασκόμηλο, ενώ η μικρότερη για αυτό από τη Μαντζουράνα και το Φλισκούνι που βρέθηκε ίση με 35% και 36%, αντίστοιχα, ενώ τα αφεψημάτα από Δίκταμο και Θυμάρι προκάλεσαν μείωση της τάξης του 43% και 42%, αντίστοιχα.

Αντίθετα με τα αποτελέσματα στα HT29 είναι αυτά που παρατηρήθηκαν σχετικά με τη δράση των αφεψημάτων στα επίπεδα του NF-κΒ στα PC3. Συγκεκριμένα, με εξαίρεση το Σπαθόχορτο όλα τα υπόλοιπα βότανα αναστέλλουν σημαντικά τον NF-κΒ. Η μεγαλύτερη μείωση, της τάξης του 75% παρατηρήθηκε και σε αυτή την κυτταρική σειρά για το αφέψημα από Φασκόμηλο, ενώ η μικρότερη μείωση -43%, βρέθηκε να είναι μετά από επώαση των κυττάρων με το αφέψημα από Δίκταμο. Για τα υπόλοιπα βότανα η μείωση που σημειώθηκε κυμάνθηκε μεταξύ 60-70%.

Οι αναφορές σχετικά με την επίδραση των βοτάνων που μελετήθηκαν στα επίπεδα ενεργοποίησης του NF-κΒ είναι πολύ περιορισμένες. Παρόλο αυτά, κάποια από τα φαινορικά συστατικά που περιέχουν τα βότανα έχουν μελετηθεί αναφορικά με την ικανότητά τους να επηρεάζουν τόσο την ενεργοποίηση του NF-κΒ, όσο και τη δέσμευσή του στις θέσεις «στόχος» στο DNA, με αντιφατικά μερικές φορές αποτελέσματα, κάτι που παρατηρήθηκε και στην παρούσα μελέτη. Συγκεκριμένα, η χρυσίνη και το ελλαγικό οξύ μειώνουν την ενεργοποίηση του NF-κΒ στα Caco-2, τα οποία είχαν προηγουμένα διεγερθεί είτε με LPS, είτε με IL-1, είτε τέλος

με TNF- α (Romier *et al.*, 2008). Επιπρόσθετα, η χρυσίνη (3 μ mol/L) βρέθηκε ότι μειώνει την ενεργοποίηση του NF- κ B στα, διεγερμένα με TNF- α , A549. Σε αντίθεση με τα προαναφερθέντα, η χρυσίνη προκάλεσε αύξηση της δεσμευτικής ικανότητας αυτού του μεταγραφικού παράγοντα στο DNA, ενώ οδήγησε και σε αυξημένη ενεργοποίησή του όταν χορηγήθηκε σε μακροφάγα κύτταρα ποντικού τα οποία είχα υποστεί διέγερση με LPS (Woo *et al.*, 2005). Αντικρουόμενα αποτελέσματα βρέθηκαν, επίσης, μελετώντας τη δράση και άλλων δύο πολυφαινολικών συστατικών, της γενιστεΐνης και της ρεσβερατρόλης. Και οι δύο ενώσεις φαίνεται να επάγουν την ενεργοποίηση του NF- κ B σε διεγερμένα είτε με LPS, είτε με IL-1, είτε τέλος με TNF- α κύτταρα του παχέος εντέρου, Caco-2 (Romier *et al.*, 2008). Ωστόσο, αναφορικά με τη γενιστεΐνη, η μελέτη των Li και συνεργατών (2005) ανέδειξε την ικανότητά της να μειώνει την ενεργοποίηση του NF- κ B στα PC3. Επίσης, η ρεσβερατρόλη βρέθηκε να μειώνει την ενεργοποίηση του μορίου στα THP-1, U937, HeLa και H4 (Holmes-McNary *et al.*, 2000, Manna *et al.*, 2000, Csiszar *et al.*, 2006). Επιπλέον, η μελέτη της επίδρασης της ρεσβερατρόλης στα, διεγερμένα με TNF- α , MCF7 ανέδειξε την ικανότητα της ένωσης αυτής να εμποδίζει τη δέσμευση του NF- κ B στο DNA (Banerjee *et al.*, 2002). Ένα ακόμα φαινολικό μόριο που έχει εκτενώς μελετηθεί είναι ο EGCG, που βρέθηκε να αναστέλλει την ενεργοποίηση του NF- κ B στις καρκινικές κυτταρικές σειρές A431 (Gupta *et al.*, 2004) και LNCaP (Hastak *et al.*, 2003). Μία ερμηνεία που προτάθηκε για να εξηγήσει τα αντιφατικά αποτελέσματα της επίδρασης των πολυφαινολών στα επίπεδα ενεργοποίησης του NF- κ B στις κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου με των υπολοίπων που έχουν μελετηθεί είναι ότι υπάρχουν πιθανώς διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια που ευθύνονται για την ενεργοποίηση του NF- κ B ως απάντηση στα διάφορα φαινολικά συστατικά. Η διαφορετικότητα αυτή των κυττάρων του εντερικού επιθηλίου μπορεί να σχετίζεται με την παρατεταμένη έκθεση τους σε μεγάλες συγκεντρώσεις πολυφαινολικών συστατικών, σε σχέση με τα κύτταρα του αίματος και των υπολοίπων οργάνων που εκτίθενται σε συγκριτικά πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις (Romier *et al.*, 2008).

Έχει ήδη αναφερθεί ότι για τη ρύθμιση των επιπέδων έκκρισης της IL-8 σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF- κ B. Για να βρεθεί εάν η μείωση που παρατηρήθηκε στα εκκρινόμενα επίπεδα της IL-8, μετά από την επίδραση με τα εκχυλίσματα των βοτάνων, μπορεί να αποδοθεί στην παρεμπόδιση της ενεργοποίησης του NF- κ B από αυτά, έγινε συσχέτιση των αποτελεσμάτων που μετρήθηκαν, τόσο στα HT29, όσο και στα PC3. Αναφορικά με τα αποτελέσματα που προέκυψαν, δε βρέθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της IL-8 και της απενεργοποίησης του NF- κ B. Το γονίδιο της IL-8 βρίσκεται κάτω από τη ρύθμιση του NF- κ B, ωστόσο και άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες μπορούν να προκαλέσουν την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της. Συγκεκριμένα, ο υποκινητής του

γονιδίου της IL-8 περιλαμβάνει επίσης θέσεις πρόσδεσης για την AP-1, καθώς και για άλλους μεταγραφικούς παράγοντες (redox-responsive transcription factors) (Kunsch & Rosen, 1993, Mukaida *et al.*, 1994). Δεδομένου ότι τα βότανα που μελετήθηκαν προκάλεσαν αναστολή της έκκρισης της IL-8 ήδη από τις 24h επώασης των κυττάρων με αυτά, ενώ η μείωση της ενεργοποίησης του NF-κΒ δε βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντική, είναι προφανές ότι κάποιος άλλος μηχανισμός εμπλέκεται και θα μπορούσε να δώσει ερμηνεία σε αυτές τις παρατηρήσεις. Έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά ότι τα φυτοχημικά μπορούν να επηρεάσουν τα επίπεδα διαφόρων παραγόντων που σχετίζονται με τον καρκίνο, μέσω αναστολής/επαγωγής της ενεργοποίησης του NF-κΒ ή/και της AP-1, καθώς και μέσω της εμπόδισης της πρόσδεσης των μορίων αυτών στις θέσεις «στόχος» στο DNA (Shimizu & Weinstein, 2005). Επιπρόσθετα, ανάλογα με την κυτταρική σειρά που μελετάται, για την έκφραση του γονιδίου της IL-8, απαιτείται η συνεργασία της AP-1 και του NF-κΒ (Mukaida *et al.*, 1994).

Ολοκληρώνοντας, όπως αναφέρεται στην ενότητα 3.7, για τη ρύθμιση των επιπέδων της ενδοκυττάριας GSH, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει ο NF-κΒ, καθώς η έκφραση των υπομονάδων της γ-GCL βρίσκεται κάτω από τον έλεγχό του. Δεδομένου λοιπόν ότι η μεταβολή που σημειώθηκε, μετά από 24h επώασης με τα αφεψήματα των βοτάνων, στην ενεργοποίηση του NF-κΒ δε βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντική και για τις δυο κυτταρικές σειρές, ίσως να αποτελεί μια πιθανή ερμηνεία και για τη διατήρηση των επιπέδων της GSH. Είναι προφανές, ωστόσο ότι δε μπορεί να προκύψει κάποιο ασφαλές συμπέρασμα, αναφορικά με το μηχανισμό με τον οποίο επηρεάζουν τα αφεψήματα των βοτάνων τους δείκτες που μελετήθηκαν, και απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για τον ακριβή προσδιορισμό της δράσης τους.

Επίλογος-Συμπεράσματα

Παρά τη μεγάλη πρόοδο που έχει σημειωθεί, τις τελευταίες δεκαετίες, στη συμβατική θεραπεία του καρκίνου, η νόσος αυτή εξακολουθεί να αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου σε παγκόσμιο επίπεδο. Ελπιδοφόρα είναι, ωστόσο, τα αποτελέσματα επιδημιολογικών ερευνών που τονίζουν τη σημασία υιοθέτησης ενός υγιεινού τρόπου ζωής, ως ένας παράγοντας που μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο εμφάνισης του καρκίνου. Η κατανάλωση φρούτων, λαχανικών, προϊόντων ολικής άλεσης και αφεψημάτων από βότανα, τροφές που αποτελούν σημαντικό κομμάτι της Μεσογειακής Διατροφής, έχει συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου, κυρίως των τύπων που σχετίζονται με τη διατροφή, όπως ο καρκίνος του παχέος εντέρου, ο καρκίνος του στομάχου, ο καρκίνος του προστάτη, ο καρκίνος των μαστών κ.α.. Η χημειοπροστατευτική δράση που παρουσιάζουν οι τροφές αυτές αποδίδεται τόσο στα μικροσυστατικά που περιέχουν, όπως βιταμίνες, μέταλλα, ιχνοστοιχεία και διαιτητικές ίνες, όσο και σε ενώσεις που δεν παρουσιάζουν θεραπευτική αξία, όπως οι πολυφαινόλες.

Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι τα αφεψήματα βοτάνων της Ελληνικής χλωρίδας, περιέχουν πολυφαινολικά συστατικά, μέρος των οποίων ανήκουν στα φλαβονοειδή και συγκεκριμένα στις φλαβονόλες. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση αυτών των ουσιών εντοπίστηκε στο αφέψημα από Σπαθόχορτο, ενώ η μικρότερη σε αυτό από Δενδρολίβανο. Ωστόσο αξιόλογη ήταν η ποσότητα των ολικών πολυφαινολών που υπολογίστηκε για όλα τα αφεψήματα βοτάνων.

Επιπλέον, μετά από τη μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας που επιδεικνύουν, βρέθηκε ότι το αφέψημα με την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα ήταν αυτό του Σπαθόχορτου, ενώ και πάλι η μικρότερη εντοπίστηκε σε αυτό του Δενδρολίβανου. Επιπρόσθετα, η αντιοξειδωτική ικανότητα των αφεψημάτων φάνηκε να βρίσκεται σε άμεση συσχέτιση με το πολυφαινολικό περιεχόμενο τους.

Όσον αφορά τις βιολογικές δράσεις των αφεψημάτων των βοτάνων που μελετήθηκαν, βρέθηκε ότι στο σύνολό τους τα αφεψήματα είναι ικανά να αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των HT29 και των PC3 κυττάρων. Ωστόσο, η ικανότητά τους να αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ήταν εξαρτημένη από τον τύπο των κυττάρων που μελετήθηκε. Συγκεκριμένα, για τα HT29, με σειρά αύξουσας δραστηριότητας, τα αφεψήματα των βοτάνων κατατάχθηκαν ως εξής: Χαμομήλι < Μαντζουράνα < Σπαθόχορτο < Ρίγανη < Φλισκούνι < Φασκόμηλο < Τσάι Βουνού < Αντριναΐδα < Θρύμπα < Θυμάρι < Δενδρολίβανο < Δίκταμο, ενώ για τα PC3: Χαμομήλι < Τσάι Βουνού < Θυμάρι < Σπαθόχορτο < Δενδρολίβανο < Αντριναΐδα < Ρίγανη < Φασκόμηλο < Φλισκούνι < Μαντζουράνα < Θρύμπα < Δίκταμο. Επιπλέον, βρέθηκε

ότι στην πλειοψηφία τους τα αφεψήματα των βοτάνων επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των HT29 και PC3 κυττάρων με δοσο- και χρονο- εξαρτώμενο τρόπο.

Συνεχίζοντας, δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των HT29 και των PC3 μετά την επίδραση των αφεψημάτων των βοτάνων. Το συμπέρασμα αυτό προέκυψε μετά τη μέτρηση των επιπέδων της ενδοκυττάριας GSH, τα οποία δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μείωση μετά την επίδραση των αφεψημάτων των βοτάνων, τόσο στα HT29, όσο και στα PC3.

Η ικανότητα των αφεψημάτων των βοτάνων να επηρεάζουν την έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών εκτιμήθηκε με τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκκρισης της IL-8. Βρέθηκε ότι στη πλειοψηφία τους τα αφεψήματα αναστέλλουν σημαντικά την εκκρινόμενη ποσότητα της IL-8 και στις δυο κυτταρικές σειρές που εξετάστηκαν. Επιπρόσθετα, βρέθηκε να υπάρχει θετική συσχέτιση της αναστολής και του χρόνου επώασης με τα αφεψήματα των βοτάνων, κυρίως στα PC3, όπου σημειώθηκε και η μεγαλύτερη αναστολή.

Βρέθηκε ότι ο μηχανισμός, μέσω του οποίου τα αφεψήματα των βοτάνων προκαλούν τη μείωση στα επίπεδα έκκρισης της IL-8, είναι ανεξάρτητος ή σχετίζεται ελάχιστα με τον NF-κB, κυρίως στα HT29. Η αναστολή της ενεργοποίησης του μορίου αυτού, η οποία φαίνεται να σχετίζεται θετικά με το χρόνο, εξαρτάται από την κυτταρική σειρά που μελετάται. Συγκεκριμένα, η μείωση που παρατηρήθηκε στα επίπεδα του ενεργοποιημένου NF-κB, μετά από την επώαση με τα αφεψήματα των βοτάνων, ήταν μεγαλύτερη στα PC3, συγκριτικά με τα HT29. Συνολικά και για τις δύο κυτταρικές σειρές τα πιο δραστικά βότανα για την αναστολή της ενεργοποίησης του NF-κB ήταν το Δίκταμο, το Θυμάρι, η Μαντζουράνα, το Φασκόμηλο και το Φλισκούνη.

Εν κατακλείδι, επιπλέον μελέτες πρέπει να γίνουν για να προσδιοριστεί ο μηχανισμός με τον οποίο δρουν τα αφεψήματα των συγκεκριμένων βοτάνων, καθώς και ο τρόπος που επηρεάζουν τα υπόλοιπα μόρια και σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στον καρκίνο. Επιπρόσθετα, πρέπει να πραγματοποιηθούν μελέτες σχετικά με την πιθανή αλληλεπίδραση των συστατικών των βοτάνων με τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται έως τώρα για την θεραπεία του καρκίνου, πριν γίνει οποιαδήποτε σύσταση διατροφικής παρέμβασης, ενώ πρέπει να συλλεχθούν και τοξικολογικά δεδομένα. Η μελέτη αυτή ήταν ένα πρώτο βήμα για τον προσδιορισμό της βιολογικής δράσης των ροφημάτων βοτάνων που παραδοσιακά καταναλώνονται στην Ελλάδα, δίνοντας ενδείξεις για τις χημειοπροστατευτικές τους ιδιότητες.

Βιβλιογραφία

- Adhami VM, Afaq F, Ahmad N. Involvement of the retinoblastoma (pRb)-E2F/DP pathway during antiproliferative effects of resveratrol in human epidermoid carcinoma (A431) cells. 2001, *Biochem Biophys Res Commun*, 288 (3), 579-585
- Adhami VM, Ahmad N, Mukhtar H. Molecular targets for green tea in CaP prevention. 2003, *J Nutr*, 133, 2417-24
- Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, et al. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. 2004, *Anticancer Res*, 24 (5), 2783-840
- Aggarwal BB, Sethi G, Ahn KS, et al. Targeting signal-transducer and activator-of-transcription-3 for prevention and therapy of cancer: modern target but ancient solution. 2006, *Ann NY Acad Sci*, 1091, 151-169
- Aggarwal BB, Vijayalekshmi RV, Sung B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. 2009, *Clin Cancer Res*, 15 (2), 425-430
- Aherne SA, Kerry JP, O'Brien NM. Effects of plant extracts on antioxidant status and oxidant-induced stress in Caco-2 cells. 2007, *Br J Nutr*, 97, 321-328
- Ahmad N, Adhami VM, Afaq F, et al. Resveratrol causes WAF-1/p21-mediated G(1)-phase arrest of cell cycle and induction of apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. 2001, *Clin Cancer Res*, 7, 1466-1473
- Ahmed FE. Effect of diet, life style, and other environmental/chemopreventive factors on colorectal cancer development, and assessment of the risks. 2004, *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 22, 91-147
- Alao JP. The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. 2007, *Mol Cancer*, 6, 24
- Albanoa SM, Maria G, Miguelb MG. Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. 2011, *Industr Crops Products*, 33, 338-343
- Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, et al. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two Origanum Species. 2001, *J Agric Food Chem*, 49, 4168-4170
- Ames BN. Endogenous DNA damage as related to cancer and aging. 1989, *Mutat Res*, 214, 41-46
- Andreasen MF, Landbo AK, Christensen LP, et al. Antioxidant effects of phenolic rye (*Secale cereale* L.) extracts, monomeric hydroxycinnamates, and ferulic acid dehydrodimers on human low-density lipoproteins. 2001, *J Agric Food Chem*, 49 (8), 4090-4096
- Aravindaram K, Yang NS. Anti-Inflammatory plant natural products for cancer therapy. 2010, *Planta Med*, 76, 1103-1117

- Argyropoulou C, Papadatou M, Gregoriades K, et al. Carvacrol content of cultivated in North Greece *Origanum dictamnus* L. 2009, *J Agric Food Chem*, 12
- Armata M, Gabrieli C, Termentzi A, et al. Constituents of *sideritis syriaca* ssp. *syriaca* (Lamiaceae) and their antioxidant capacity. 2008, *Food Chem*, 111, 179-186
- Arunasree KM. Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. 2010, *Phytomedicine*, 17, 581-588
- Astorg P. Dietary N-6 and N-3 polyunsaturated fatty acids and prostate cancer risk: a review of epidemiological and experimental evidence. 2004, *Cancer Causes Control*, 15, 367-386
- Athar M, Back JH, Kopelovich L, et al. Multiple molecular targets of resveratrol: Anti-carcinogenic mechanisms. 2009, *Arch Biochem Biophys*, 486, 95-102
- Atoui AK, Mansouri A, Boskou G, et al. Tea and herbal infusion: Their antioxidant activity and phenolic profile. 2005, *Food Chem*, 89 (1), 27-36
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, et al. Antigenotoxic effects of three essential oils in diploid yeast (*S. cerevisiae*) after treatments with UV radiation, 8-MPO plus UVA, and MMS. 2006, *Mutat Res*, 606, 27-38
- Balendiran GK, Dabur R, Fraser D. The role of glutathione in cancer. 2004, *Cell Bioch Fun*, 22, 343-352
- Bampidis VA, Christodoulou V, Florou-Paneri P, et al. Effect of dried oregano leaves versus neomycin in treating newborn calves with colibacillosis. 2006, *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 53, 154-156
- Banerjee S, Bueso-Ramos C, Aggarwal BB. Suppression of 7, 12-dimethylbenz (α)anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats by resveratrol: role of nuclear NF κ B, cyclooxygenase 2 and matrix metalloprotease 9. 2002, *Cancer Res*, 62, 4949-4954
- Barberan FA, Clifford MN. Dietary hydroxybenzoic acid derivatives-nature, occurrence and dietary burden. 2000, *J Sci Food Agric*, 80 (7), 1024-1032
- Batist G, Schecter RL, Alaoui-Jamali MA. The glutathione system and drug resistance. 1996, *Cancer Drug Pharm*, 23, 503-521
- Becker LB. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. 2004, *Cardiovasc Res* 61, 461-470
- Begley LA, Kasina S, Mehra R, et al. CXCL5 promotes prostate cancer progression. 2008, *Neoplasia*, 10, 244-54
- Beier R, Burgin A, Kiermaier A, et al. Induction of cyclin E-cdk2 kinase activity, E2F-dependent transcription and cell growth by Myc are genetically separable events. 2000, *EMBO J*, 19, 5813-5823

- Belcher RD, Marker PH, Geiger P, et al. Low-density lipoprotein susceptibility to oxidation and cytotoxicity to endothelium in sickle cell anemia. 1999, *J Lab Clin Med*, 133, 605-612
- Benitez DA, Pozo-Guisado E, Alvarez-Barrientos A, et al. Mechanisms involved in resveratrol-induced apoptosis and cell cycle arrest in prostate cancer-derived cell lines. 2007, *J Androl*, 28, 282-293
- Berliner A, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. 1996, *Free Radic Biol Med*, 20, 707-727
- Bhardwaj A, Sethi G, Vadhan-Raj S, et al. Resveratrol inhibits proliferation, induces apoptosis, and overcomes chemoresistance through downregulation of STAT3 and nuclear factor kappaB-regulated antiapoptotic and cell survival gene products in human multiple myeloma cells. 2007, *Blood*, 109, 2293-2302
- Bharti AC, Donato N, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive and IL6-inducible STAT3 phosphorylation in human multiple myeloma cells. 2003, *J Immunol*, 171, 3863-3871
- Bierhaus A, Zhang Y, Quehenberger P, et al. The dietary pigment curcumin reduces endothelial tissue factor gene expression by inhibiting binding of AP-1 to the DNA and activation of NF-kappa B. 1997, *Thromb Haemost*, 77, 772-782
- Birrell MA, McCluskie K, Wong S, et al. Resveratrol, an extract of red wine, inhibits lipopolysaccharide induced airway neutrophilia and inflammatory mediators through an NF- κ B- independent mechanism. 2005, *FASEB J*, 19 (7), 840-841
- Block G, Patterson B, Subar A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. 1992, *Nutr Cancer*, 18, 1-29
- Boudet AM. Evolution and current status of research in phenolic compounds. 2007, *Phytochemistry*, 68, 2722-2735
- Braga P, DalSasso M, Culici M, et al. Anti-inflammatory activity of thymol: inhibitory effect on the release of human neutrophil elastase. 2006, *Pharmacol*, 77, 130-136
- Braga P, DalSasso M, Culici M, et al. Antioxidant potential of thymol determined by chemiluminescence inhibition in human neutrophils and cell-free systems. 2006, *Pharmacol*, 676, 61-68
- Bravo L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. 1998, *Nutr Rev*, 156, 317-333
- Brown NS, Bicknell R. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. 2001, *Breast Cancer Res*, 3, 323-327

- Butterfield DA, Castegna A, Pocernich CB, et al. Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. 2002, *J Nutr Biochem*, 13, 444-461
- Camejo-Rodrigues J, Ascensão L, Bonet MA, et al. An ethnobotanical study of medicinal and aromatic plants in the Natural Park of Serra de S. Mamede (Portugal). 2003, *J Ethnopharmacol*, 89, 199-209
- Capecka E, Mareczek A, Leja M. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. 2005, *Food Chem*, 93 (2), 223-226
- Carvalho AM. Etnobotánica del Parque Natural de Montesinho. 2005, *Plantas, Tradición y Saber Popular en un Territorio del Nordeste de Portugal*. Universidad Autónoma: Madrid
- Cassidy A, Hansley B, Lamuela-Raventos RM. Isoflavones, lignans and stilbenes-origins, metabolism and potential importance to human health. 2000, *J Sci Food Agric*, 80, 1044-62
- Chatzopoulou A, Karioti A, Gousiadou C, et al. Depsides and other polar constituents from *Origanum dictamnus* L. and their in vitro antimicrobial activity in clinical strains. 2010, *J Agric Food Chem*, 58, (10), 6064-6068
- Chen Z, Gu K, Zheng W, et al. The use of complementary and alternative medicine among Chinese women with breast cancer. 2008, *J Altern Complement Med*, 14, 1049-1055
- Cheynier V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. 2005, *Am. J. Clin Nutr*, 81 (1), 223-229
- Chi YS, Jong HG, Son KH, et al. Effect of naturally occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: cyclooxygenases and lipoxygenases. 2001, *Biochem Pharmacol*, 62, 1185-1191
- Clark M. Wild herbs in the marketplace. Studies of culture and environment on the european fringe. 1997, Lanham: Rowman and Littlefield Publishers, 215-236
- Connolly JD, Hill R. Triterpenes. 2007, *Natural Prod Rep*, 24, 465-86
- Couladis M, Tzakou O, Verykokidou E, et al. Screening of some Greek aromatic plants for antioxidant activity. 2003, *Phytother Res*, 17 (2), 194-195
- Craig J. Health promoting properties of common herbs. 1999, *Am J Clin Nutr*, 70 (3), 491-499
- Cross AJ, Sinha R. Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer. 2004, *Environ Mol Mutagen*, 44, 44-55
- Csiszar A, Smith K, Labinskyy N, et al. Resveratrol attenuates TNF- α -induced activation of coronary arterial endothelial cells: role of NF- κ B inhibition. 2006, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291, 1694-1699
- D'Archivio M, Files C, Di Benedetto R. Polyphenols dietary sources and bioavailability. 2007 *Ann Sup San*, 43 (4), 348-361

- Das D, Arber N, Jankowski JA. Chemoprevention of colorectal cancer. 2007, *Digestion*, 76, 51-67
- Dauchet L, Amouyet P, Dallongeville J. Fruit and vegetable consumption and risk of stroke. A meta-analysis of cohort studies. 2005, *Neurology*, 65, 1193-1197
- de Kok TM, van Breda SG, Manson MM. Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds: a review. 2008, *Eur J Nutr*, 47, 51-59
- DeCosse JJ, Miller HH, Lesser ML. Effect of wheat fiber and vitamins C and E on rectal polyps in patients with familial adenomatous polyposis. 1989, *J Natl Cancer Inst*, 1, 1290-1297
- Dihal AA, Woutersen RA, van Ommen B, et al. Modulatory effects of quercetin on proliferation and differentiation of the human colorectal cell line Caco-2. 2006, *Cancer Lett*, 238, 248-59
- Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, et al. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. 2006, *Food Chem*, 97, 654-660
- Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. 1981, *J Natl Cancer Inst*, 66, 1191-1308
- Dreher D, Junod AF. Role of oxygen free radicals in cancer development. 1996, *Eur J Cancer*, 32, 30-38
- Durackova Z. Some current insights into oxidative stress. 2010, *Physiol Res*, 59, 459-469
- Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. 2003, *Nat Rev Cancer*, 3, 859-868
- Engl T, Relja B, Blumenberg C, et al. Prostate tumor CXC-chemokine profile correlates with cell adhesion to endothelium and extracellular matrix. 2006, *Life Sci*, 78, 1784-93
- Estrov Z, Shishodia S, Faderl S, et al. Resveratrol blocks interleukin-1 β -induced activation of the nuclear transcription factor NF- κ B, inhibits proliferation, causes S-phase arrest, and induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells. 2003, *Blood*, 102, 987-995
- Etter SC. *Rosmarinus officinalis* as an antioxidant. 2005, *J Herbs Spices Med Plants*, 11 (1), 121-159
- Exarchou V, Nenadis N, Tsimidou M, et al. Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage and summer savory. 2002, *J Agric Food Chem*, 50, 5294-5299
- Fecka I, Turek S. Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. 2008, *Food Chem*, 108, 1039-1053

- Figueredo G, Cabassu P, Chalchat JC, et al. Studies of Mediterranean oregano populations VIII chemical composition of essential oils of oregano of various origins. 2006, *Flav Frag J*, 21, 134-139
- Fontecave M, Lepoivre M, Elleingand E, et al. Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. 1998, *FEBS Lett*, 421, 277-279
- Frostegard J, Wu R, Giscombe R, et al. Induction of T-cell activation by oxidized low density lipoprotein. 1992, *Arterioscler Thromb*, 12, 461-467
- Gachkar L, Yadegari D, Rezaei MB, et al. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. 2007, *Food Chem*, 102 (3), 898-904
- Galati G, Sabzevari O, Wilson JX, et al. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. 2002, *Toxicology*, 177, 91-104
- Gauliard B, Grieve D, Wilson R, et al. The effects of dietary phenolic compounds on cytokine and antioxidant production by A549 cells. 2008, *J Med Food*, 11 (2), 382-384
- Goncalves P, Araujo JR, Martel F. Effect of some natural mineral waters in nutrient uptake by caco-2 cells. 2010, *Int J Vitam Nutr Res*, 80, 131-43
- Gonda TA, Tu S, Wang TC. Chronic inflammation, the tumor microenvironment and carcinogenesis. 2009, *Cell Cycle*, 8, 2005-2013
- Goossens V, De Vos K, Vercammen D, et al. Redox regulation of TNF signaling. 1999, *Biofactors*, 10, 145-156
- Guimarães R, Barreira CM, Barros L, et al. Effects of oral dosage form and storage period on the antioxidant properties of four species used in traditional herbal medicine. 2011, *Phytother Res*, 25, 484-492
- Gupta S, Hastak K, Afaq F, et al. Essential role of caspases in EGCG-mediated inhibition of nuclear factor kappa B and induction of apoptosis. 2004, *Oncogene*, 14, 2507-2522
- Hague A, Butt AJ, Paraskeva C. The role of butyrate in human colonic epithelial cells: an energy source or inducer of differentiation and apoptosis? 1996, *Proc Nutr Soc*, 55, 937-943
- Half E, Arber N. Colon cancer: preventive agents and the present status of chemoprevention. 2009, *Expert Opin Pharmacother*, 10, 211-219
- Halliwell B, Cross CE. Oxygen-derived species: Their relation to human disease and environmental stress. 1994, *Envir Health Perspect*, 102, 5-12
- Hämäläinen M, Nieminen R, Vuorela P, et al. Antiinflammatory effects of flavonoids: Genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT1 and NF- κ B activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF- κ B activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. 2007, *Mediators Inflamm*, 2007, 1155-1165

- Hamer HM, Jonkers D, Venema K, et al. Review article: the role of butyrate on colonic function. 2008, *Aliment Pharmacol Ther*, 27, 104-119
- Han X, Shen T, Lou H. Dietary polyphenols and their biological significance. 2007, *Int J Mol Sci*, 8, 950-988
- Hartman RE, Shah A, Fagan AM, et al. Pomegranate juice decreases amyloid load and improves behavior in a mouse model of Alzheimer's disease. 2006, *Neurobiol Dis*, 24, 506-515
- Hastak K, Gupta S, Ahmad N, et al. Role of p53 and NF- κ B in epigallocatechingallate- induced apoptosis of LNCap cells. 2003, *Oncogene*, 22, 4851-4859
- Hazzit M, Baaliouamer A, Faleiro ML, et al. Composition of the essential oils of *Thymus* and *Origanum* species from Algeria and their antioxidant and antimicrobial activities. 2006, *J Agric Food Chem*, 54, 6314-6321
- Heidemann J, Ogawa H, Dwinell MB, et al. Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. 2003, *J Biol Chem*, 278, 8508-8515
- Heim KE, Tagliaferro AT, Bobilya D. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. 2002, *J Nutr Bioch*, 13, 572-584
- Hirsch J, Johnson CL, Nelius T, et al. PEDF inhibits IL8 production in prostate cancer cells through PEDF receptor/phospholipase A2 and regulation of NF- κ B and PPAR γ . 2011, *Cytokine*, (in press)
- Ho CT, Wang M, Huang GJ, et al. Chemistry and antioxidative factors in rosemary and sage. 2000, *Biofactors*, 13, 161-166
- Hobbs C. St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.): a review. 1998, *Herbal Gram*, 18, 24-34
- Hollman PC. Bioavailability of flavonoids. 1997, *Eur J Clin Nutr*, 51 (1), 66-69
- Holmes-McNary M, Baldwin AS. Chemopreventive properties of trans-resveratrol are associated with inhibition of activation of the I κ B kinase. 2000, *Cancer Res*, 60, 3477-3483
- Hong J, Smith TJ, Ho CT, et al. Effects of purified green and black tea polyphenols on cyclooxygenase- and lipoxygenase-dependent metabolism of arachidonic acid in human colon mucosa and colon tumor tissues. 2001, *Biochem Pharmacol*, 62, 1175-1183
- Hong RL, Spohn WH, Hung MC. Curcumin inhibits tyrosine kinase activity of p185neu and also depletes p185neu. 1999, *Clin Cancer Res*, 5, 1884-1891
- Hu FB. Plant-based foods and prevention of cardiovascular disease: an overview. 2003, *Am J Clin Nutr*, 78 (3), 544-551
- Huang WY, Cai YZ, Zhang Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. 2009, *Nutr Cancer*, 62 (1), 1-20

- Hussain IV, Anwar F, Chatha SA, et al. Rosmarinus officinalis essential oil: Antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. 2010, Braz J Microbiol, 41, 1070-1078
- Hussain T, Gupta S, Adhami VM, Mukhtar, et al. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate selectively inhibits COX-2 without affecting COX-1 expression in human prostate carcinoma cells. 2005, Int J Cancer, 113, 660-669
- Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, et al. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. 2003, Curr Med Chem, 10, 2495-2505
- Ivanov NI, Cowell SP, Brown P, et al. Lycopene differentially induces quiescence and apoptosis in androgenresponsive and -independent prostate cancer cell lines. 2007, Clin Nutr 26, 252-263
- Ivanova D, Gerova D, Chervenkov T, et al. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. 2005, J Ethnopharm, 69, 145-150
- Iwuchukwu OF, Tallarida RJ, Nagar S. Resveratrol in combination with other dietary polyphenols concomitantly enhances antiproliferation and UGT1A1 induction in Caco-2 cells. 2011, Life Sci, 88, 1047-1054
- Jabs T. Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. 1999, Biochem Pharmacol, 57, 231-245
- Jemal A, Siegel R, Ward Y, et al. Cancer statistics, 2008. 2008, Cancer J Clin, 58, 71-96
- Jeong WS, Kim IW, Hu R, et al. Modulatory properties of various natural chemopreventive agents on the activation of NF-kB signaling pathway. 2004, Pharm Res, 21, 661-670
- Jin H, Tan X, Liu X, et al. The study of effect of tea polyphenols on microsatellite instability colorectal cancer and its molecular mechanism. 2010, Int J Colorectal Dis, 25, 1407-1415
- Joe AK, Liu H, Suzui M, et al. Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. 2002, Clin Cancer Res, 8, 893-903
- Johnson IT. Phytochemicals and cancer. 2007, Proc Nutr Soc, 66, 207-215
- Johnson JJ. Carnosol: A promising anti-cancer and anti-inflammatory agent. 2001, Cancer Lett, 305, 1-7
- Kachadourian R, Day BJ. Flavonoid-induced glutathione depletion: Potential implications for cancer treatment. 2006, Free Rad Biol Med, 41, 65-76
- Kahkonen M, Hopia A, Vuorela HJ, et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. 1999, J Agric Food Chem, 47, 3954-3962
- Karanika MS, Komaitis M, Aggelis G. Effect of aqueous extracts of some plants of Lamiaceae family on the growth of Yarrowia lipolytica. 2001, Int J Food Microbiol, 64 (1-2), 175-181

- Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. 2007, *APMIS*, 115, 81-103
- Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. 2000, *Annu Rev Immunol*, 18, 621-663
- Karioti A, Vrahimi-Hadjilouca T, Droushiotis D, et al. Analysis of the essential oils of *Origanum dubium* growing wild in Cyprus: investigation of its antioxidant capacity and antimicrobial activity. 2006, *Planta Med*, 72, 1330-1334
- Katalinic V, Milos M, Kulisic T, et al. Screening of 70 medicinal plants for antioxidant capacity and total phenols. 2006, *Food Chem*, 94, 550-557
- Khaw KT, Wareham N, Bingham S, et al. Preliminary communication: glycated hemoglobin, diabetes, and incident colorectal cancer in men and women: a prospective analysis from the European prospective investigation into cancer-Norfolk study. 2004, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 13, 915-919
- Khuhaprema T, Srivatanakul P. Colon and rectum cancer in Thailand: an overview. 2008, *Jpn J Clin Oncol*, 38, 237-43
- Kim AL, Zhu Y, Zhu H, et al. Resveratrol inhibits proliferation of human epidermoid carcinoma A431 cells by modulating MEK1 and AP-1 signalling pathways. 2006, *Exp Dermatol*, 15, 538-546
- Kim DO, Lee CY. Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. 2004, *Crit Rev Food Sci Nutr*, 44 (4), 253-273
- Kim KJ, Lee JS, Kwak MK, et al. Anti-inflammatory action of mollugin and its synthetic derivatives in HT-29 human colonic epithelial cells is mediated through inhibition of NF- κ B activation. 2009, *Eur J Pharmacol*, 622, 52-57
- Kim WK, Bang MH, Kim ES, et al. Quercetin decreases the expression of ErbB2 and ErbB3 proteins in HT-29 human colon cancer cells. 2005, *J Nutr Biochem*, 16, 155-162
- Kiselova Y, Ivanova D, Chervenkov T, et al. Correlation between the in vitro antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Bulgarian herbs. 2006, *Phytotherapy Res*, 20, 961-965
- Klaunig X, Xu Y, Isenberg JS, et al. The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. 1998, *Environ Health Perspect*, 106 (1), 289-295
- Konig JE, Senge T, Allhoff EP, et al. Analysis of the inflammatory network in benign Prostate hyperplasia and prostate cancer. 2004, *Prostate*, 58, 121-129
- Konishi N, Shimada K, Ishida I, et al. Molecular pathology of CaP. 2005, *Pathol Int*, 55, 531-539

- Kotha A, Sekharam M, Cilenti L, et al. Resveratrol inhibits Src and Stat3 signaling and induces the apoptosis of malignant cells containing activated Stat3 protein. 2006, *Mol Cancer Ther*, 5, 621-629
- Kountouri AM, Kaliora AC, Koumbi L, Andrikopoulos NK. In-vitro gastric cancer prevention by a polyphenol-rich extract from olives through induction of apoptosis. 2009, *Eur J Cancer Prev*, 18, 33-39
- Kovarikova M, Pachernik J, Hofmanova J, et al. TNF-alpha modulates the differentiation induced by butyrate in the HT-29 human colon adenocarcinoma cell line. 2000, *Eur J Cancer*, 36, 1844-1852
- Kratchanova M, Denev P, Ciz M, et al. Evaluation of antioxidant activity of medicinal plants containing polyphenol compounds. Comparison of two extraction systems. 2010, *Acta Bioch Pol*, 57, 229-234
- Kulisic T, Dragovic-Ubelac A, Milos M. Antioxidant activity of aqueous tea infusions prepared from oregano, thyme and wild thyme. 2006, *Food Techol Biotechnol*, 44 (4), 485-492
- Kumar A, Takada Y, Boriek A.M, et al. Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. 2004, *J Mol Med*, 82, 434-448
- Kundu JK, Na HK, Chun KS, et al. Inhibition of phorbol ester-induced COX-2 expression by epigallocatechin gallate in mouse skin and cultured human mammary epithelial cells. 2003, *J Nutr*, 133, 3805-3810
- Kundu JK, Shin YK, Surh YJ. Resveratrol modulates phorbol ester-induced pro-inflammatory signal transduction pathways in mouse skin in vivo: NF-kappaB and AP-1 as prime targets. 2006, *Biochem Pharmacol*, 72, 1506-1515
- Kunsch C, Rosen CA. NF-kB subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter. 1993, *Mol Cell Biol*, 13, 6137-6146
- Kwon YI, Vatter DA, Shetty K. Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension. 2006, *Asia Pac J Clin Nutr*, 15, 107-118
- Lacy A, O'Kennedy R. Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. 2004, *Cur Pharm Des*, 10, 3797-3811
- Lambert DW, Wood IS, Ellis A, et al. Molecular changes in the expression of human colonic nutrient transporters during the transition from normality to malignancy. 2002, *Br J Cancer*, 86, 1262-1269
- Laughton MJ, Evans PJ, Moroney MA, et al. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclooxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives: Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. 1991, *Biochem Pharmacol*, 42 (9) 1673-1681

- Lemhadri A, Zeggwagh NA, Maghram M, et al. Anti-hyperglycemic activity of the aqueous extracts of *Origanum vulgare* growing wild in Tafilet region. 2004, *J Ethnopharmacol*, 92, 251-256
- Li Y, Ahmed F, Ali S, et al. Inactivation of nuclear factor κ B by soy isoflavone genistein contributes to increased apoptosis induced by chemotherapeutic agents in human cancer cells. 2005, *Cancer Res*, 65, 6934-6942
- Liang YC, Tsai SH, Chen L, et al. Resveratrol-induced G2 arrest through the inhibition of CDK7 and p34CDC2 kinases in colon carcinoma HT29 cells. 2003, *Biochem Pharmacol*, 65, 1053-1060
- Lim JW, Kim H, Kim KH. NF- κ B, inducible nitric oxide synthase and apoptosis by *Helicobacter pylori* infection. 2001, *Free Radic Biol Med*, 31 (3), 355-366
- Lin HY, Shih A, Davis FB, et al. Resveratrol induced serine phosphorylation of p53 causes apoptosis in a mutant p53 prostate cancer cell line. 2002, *J Urol*, 168, 748-755
- Lin YL, Lin JK. (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor- κ B. 1997, *Mol Pharmacol*, 52 (3), 465-472
- Liolios CC, Gortzi O, Lalas S, et al. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. 2009, *Food Chem*, 112, 77-83
- Liolios CL, Graikou K, Skaltsa E, et al. Dittany of Crete: A botanical and ethnopharmacological review. 2010, *J Ethnopharmacol*, 131, 229-241
- Liu RH. Potential Synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. 2004, *J Nutr*, 134, 3479-3485
- Lopez P, Sanchez C, Batile R, et al. Development of flexible antimicrobial films using essential oils as active agents. 2007, *J Agric Food Chem*, 55, 8814-8824
- Lowenstein CJ, Padalko E. iNOS (NOS2) at a glance. 2004, *J Cell Sci*, 117, 2865-2867
- Lu Y, Cai Z, Xiao G, et al. Monocyte chemotactic protein-1 mediates prostate cancer-induced bone resorption. 2007, *Cancer Res*, 67, 3646-3653
- Lu Y, Foo LY. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). 2001, *Food Chem*, 75, 197-202
- Lynch N, Berry D. Differences in perceived risks and benefits of herbal, over-the-counter conventional and prescribed conventional, medicines, and the implications of this for the safe and effective use of herbal products. 2007, *Complement Ther Med*, 15, 84-91
- Ma RW, Chapman K. A systematic review of the effect of diet in prostate cancer prevention and treatment. 2009, *Brit Diet Ass Ltd J Hum Nutr Diet*, 22, 187-199

- Madsen HL, Sorensen B, Skibsted LH, et al. The antioxidative activity of summer savory (*Rosmarinus officinalis* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in dressing stored exposed to light or darkness. 1998, *Food Chem*, 63, 173-180
- Mai Z, Blackburn GL, Zhou JR. Soy phytochemicals synergistically enhance the preventive effect of tamoxifen on the growth of estrogen-dependent human breast carcinoma in mice. 2007, *Carcinogenesis*, 28, 1217-1223
- Malins DC, Polissar NL, Gunselman SJ. Progression of human breast cancers to the metastatic state is linked to hydroxyl radical-induced DNA damage. 1996, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 2557-2563
- Manach C, Scalbert A, Morand C, et al. Polyphenols: Food sources and bioavailability. 2004, *Am J Clin Nutr*, 79, 727-747
- Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. IFN- α suppresses activation of nuclear transcription factors NF- κ B and activator protein 1 and potentiates TNF-induced apoptosis. 2000, *J Immunol*, 165, 4927-4934
- Manna SK, Mukhopadhyay AA, Aggarwal BB. Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF- κ B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. 2000, *J Immunol*, 164, 6509-6519
- Mariadason JM, Velcich A, Wilson AJ, et al. Resistance to butyrate-induced cell differentiation and apoptosis during spontaneous Caco-2 cell differentiation. 2001, *Gastroenterology*, 120, 889-99
- Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. 2000, *Carcinogenesis*, 21, 361-370
- Masella R, Di Benedetto R, Vari R, et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. 2005, *J Nutr Bioch*, 16 (10), 577-586
- Mehta RG, Murillo G, Naithani R, et al. Cancer chemoprevention by natural products: How far have we come? 2010, *Pharm Res*, 27, 950-961
- Meister A, Anderson ME. Glutathione. 1983, *Annu Rev Biochem*, 52, 711-760
- Meng Q, Peng Z, Chen L, Si, Dong, Xia. Nuclear Factor- κ B modulates cellular glutathione and prevents oxidative stress in cancer cells. 2010, *Cancer Lett*, 299, 45-53
- Mezzoug N, Elhadri A, Dallouh A, et al. Investigation of the mutagenic and antimutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents. 2007, *Mutat Res*, 629, 100-110
- Miles EA, Zoubouli P, Calder PC. Differential anti-inflammatory effects of phenolic compound from extra olive oil identification in human whole blood cultures. 2005, *Nutr*, 21, 389-394

- Moller JK, Madsen HL, Aaltonen T, et al. Dittany (*Origanum dictamnus*) as a source of water-extractable antioxidants. 1999, *Food Chem*, 64 (2), 215-219
- Montpied P, De Bock F, Rondouin G, et al. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents inflammatory stress in organotypic hippocampal slice cultures. 2003, *Mol Brain Res*, 115 (2), 111-120
- Moore RJ, Owens DM, Stamp G, et al. Mice deficient in tumor necrosis factor- α are resistant to skin carcinogenesis. 1999, *Nat Med*, 5, 828-831
- Moyad MA, Carroll PR. Lifestyle recommendations to prevent CaP: time to redirect our attention? 2004, *Urol Clin North Am*, 31, 289-300
- Mukaida N, Okamoto S, Ishikawa Y, et al. Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. 1994, *J Leukoc Biol*, 56, 554-558
- Mukaida N, Okamoto SI, Ishikawa Y, et al. Molecular mechanisms of interleukine-8 gene expression. 1994, *J Leukocyte Biol*, 56, 554-558
- Murray AW. Recyclin the cell cycle: cyclins revisited. 2004, *Cell*, 116 (2) 221–234
- Naczek M, Shahidi F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. 2006, *J Pharm Biomed Anal*, 41, 1523-1542
- Nakamura K, Yasunaga Y, Segawa T, et al. Curcumin downregulates AR gene expression and activation in prostate cancer cell lines. 2002, *Int J Oncol*, 21, 825-830
- Natarajan K, Singh S, Burke TR, et al. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF- κ B. 1996, *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 9090-9095
- Ness AR, Powles JW. Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: A review. 1997, *Int J Epidemiol*, 26 (1), 1-13
- Ni J, Chen M, Zhang Y, et al. Vitamin E succinate inhibits human prostate cancer cell growth via modulating cell cycle regulatory machinery. 2003, *Biochem Biophys Res Commun*, 300, 357-363
- Nothlings U, Schulze MB, Weikert C, et al. Intake of vegetables, legumes, and fruit, and risk for all-cause, cardiovascular, and cancer mortality in a European diabetic population. 2008, *J Nutr*, 138, 775-781
- Novais MH, Santos I, Mendes S, et al. Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrábida Natural Park. 2004, *J Ethnopharmacol*, 93, 183-195
- O'Leary KA, de Pascual-Teresa S, Needs PW, et al. Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. 2004, *Mutat Res*, 551, 245-254

- Ock J, Lee HA, Ismail A, et al. Differential antiproliferation effect of 2-benzoyloxycinnamaldehyde in K-ras-transformed cells via downregulation of thiol antioxidants. 2011, *Cancer Sci*, 102, 212-218
- Okabe Y, Ochiai M, Aida K. ,Mechanistic aspects of green tea as a cancer preventive: effect of components on human stomach cancer cell lines. 1999, *Jap J Cancer Res*, 90 (7), 733-739
- Ommen GS, Goodman GE, Thomquist MD, et al. Effects of a combination of carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. 1996, *N Engl J Med*, 334, 1150-1155
- Ong CS, Tran E, Nguyen TT, et al. Quercetin-induced growth inhibition and cell death in nasopharyngeal carcinoma cells are associated with increase in Bad and hypophosphorylated retinoblastoma expressions. 2004, *Oncol Rep*, 11 (3), 727-33
- Ou B, Huang D, Hampsch-Woodill M, et al. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. 2002, *J Agric Food Chem*, 50, 3122-3128
- Pandey MK, Sung B, Ahn KS, et al. Butein suppresses constitutive and inducible signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 activation and STAT3-regulated gene products through the induction of a protein tyrosine phosphatase SHP-1. 2009, *Mol Pharmacol*, 75, 525-533
- Park EJ, Pezzuto JM. Botanicals in cancer chemoprevention. 2002, *Cancer Met Rev*, 21 (3-4) 231-255
- Patel BB, Sengupta R, Qazi S, et al. Curcumin enhances the effects of 5-fluorouracil and oxaliplatin in mediating growth inhibition of colon cancer cells by modulating EGFR and IGF-1R. 2008, *Int J Cancer*, 122, 267-273
- Payne JE. Colorectal carcinogenesis. 1990, *Aust N Z J Surg*, 60, 11-18
- Peternac D, Klima I, Cecchini MG, et al. Agents used for chemoprevention of prostate cancer may influence PSA secretion independently of cell growth in the LNCaP model of human prostate cancer progression. 2008, *Prostate*, 68, 1307-1318
- Pierzchalski P, Krawiec A, Gawelko J, et al. Molecular mechanism of protection against chemically and gamma-radiation induced apoptosis in human colon cancer cells. 2008, *J Physiol Pharmacol*, 59, 191-202
- Pietzsch J, Julius U. Different susceptibility to oxidation of proline and arginine residues of apolipoprotein B-100 among subspecies of low density lipoproteins. 2001, *FEBS Lett*, 491, 123-126

- Powolny A, Singh SV. Plumbagin-induced apoptosis in human prostate cancer cells is associated with modulation of cellular redox status and generation of reactive Oxygen species. 2008, *Pharm Res*, 25 (9), 2171-2180
- Poyton RO, Ball KA, Castello PR. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. 2009, *Trends Endocrinol Metab*, 20, 332-340
- Pozo-Guisado E, Alvarez-Barrientos A, Mulero-Navarro S, et al. The antiproliferative activity of resveratrol results in apoptosis in MCF-7 but not in MDA-MB-231 human breast cancer cells: cell-specific alteration of the cell cycle. 2002, *Biochem Pharmacol*, 64, 1375-1386
- Proestos C, Kapsokefalou M, Komaitis M. Analysis of naturally occurring phenolic compounds in aromatic plant by RP-HPLC and GC-MS after silylation. 2008, *J Food Qual* 31, 402-414
- Radonic A, Milos M. Chemical composition and in vitro evaluation of antioxidant effect of free volatile compounds from *Saturaja Montana* L. 2003, *Free Radical Res*, 37, 673-679
- Rafter JJ. Scientific basis of biomarkers and benefits of functional foods for reduction of disease risk: cancer. 2002, *Br J Nutr*, 88, 219-224
- Ramos S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. 2007, *J Nutr Biochem*, 18, 427-442
- Rao AV, Rao LG. Carotenoids and human health. 2007, *Pharm Res*, 55, 207-216
- Rao BS, Shanbhoge R, Upadhy D, et al. Antioxidant, anticlastogenic and radioprotective effect of *Coleus aromaticus* on Chinese hamster fibroblast cells (V79) exposed to gamma radiation. 2006, *Mutagenesis*, 21, 237-242
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga J, et al. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. 1996, *Free Rad Biol Med*, 20, 933-956
- Ritchie MR. Use of herbal supplements and nutritional supplements in the UK: what do we know about their pattern of usage? 2007, *Proc Nutr Soc.*, 66, 479-482
- Robards K, Prenzler PD, Tucker G, et al. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. 1999, *Food Chem*, 66 (4), 401-436
- Romier B, Van De Walle J, During A, et al. Modulation of signalling nuclear factor-kB activation pathway by polyphenols in human intestinal Caco-2 cells. 2008, *Br J Nutr*, 100, 542-551
- Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. 2002, *Ann Rev Nutr*, 22, 19-34
- Rucinska A, Kirko C, Gabryelak T. Effect of the phytoestrogen, genistein-8-C-glucoside, on Chinese hamster ovary cells in vitro. 2007, *Cell Biol Int*, 31 (11), 1371-1378

- Russo M, Galletti GC, Bocchini P, et al. Essential oil composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* spp. *Hirtum* (Link) Ietswaart): a preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. 1. Inluorescences. 1998, J Agric Food Chem, 46, 3741-3746
- Saddique Z, Naeem I, Maimoona A. A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. 2010, J Ethnopharmacol, 131, 511-521
- Sahin F, Karaman I, Gulluce M, et al. Evaluation of antimicrobial activities of *Satureja hortensis* L. 2003, J Ethnopharmacol, 87, 61-65
- Sasaki K, Wada K, Tanaka Y, et al. Thyme leaves and its constituents increase the activities of xenobiotic-metabolizing enzymes in mouse liver. 2005, J Med Food, 8, 184-189
- Scalbert A, Manach C, Morand C, et al. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. 2005, Crit Rev Food Sci Nutr, 45 (4), 287-306
- Seaton A, Scullin P, Maxwell PJ, et al. Interleukin-8 signaling promotes androgen-independent proliferation of prostate cancer cells via induction of androgen receptor expression and activation. 2008, Carcinogenesis, 29, 1148-1156
- Selvendiran K, Koga H, Ueno T, et al. Luteolin promotes degradation in signal transducer and activator of transcription 3 in human hepatoma cells: an implication for the antitumor potential of flavonoids. 2006, Cancer Res, 66, 4826-4834
- Shahidi F, Wanasundara OT. Phenolic antioxidants. 1992, Crit Rev Food Sci Nutr, 32, 67-103
- Shan B, Yizhong YZ, Sun M, et al. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. 2005, J Agric Food Chem, 53, 7749-7759
- Shanmugam MK, Radhamani K, Gautam S. Targeting cell signaling and apoptotic pathways by dietary agents: role in the prevention and treatment of cancer. 2011, Nutr Cancer, 63 (2), 161-173
- Shannon J, White AL, Shattuck AL, et al. Relationship of food groups and water intake to colon cancer risk. 1996, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 5, 495-502
- Shen F, Chen SJ, Dong XJ, et al. Suppression of IL-8 gene transcription by resveratrol in phorbol ester treated human monocytic cells. 2003, J Asian Nat Prod Res, 5, 151-157
- Shilsky R, Milano RA, Ratain MJ, et al. Principles of antineoplastic drug development and pharmacology. 1996, Dekker, 503-521
- Shimizu M, Weinstein IB. Modulation of signal transduction by tea catechins and related phytochemicals. 2005, Mut Res, 591, 147-160
- Sierra-Rivera E, Meredith MJ, Summar ML, et al. Genes regulating glutathione concentrations in X-ray-transformed rat embryo fibroblasts: changes in gamma-glutamylcysteine synthetase and gamma-glutamyltranspeptidase expression. 1994, Carcinogenesis, 15, 1301-1307

- Signorelli P, Ghidoni R. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. 2005, *J Nutr Bioch*, 16, 449-466
- Singh RP, Tyagi A, Sharma G, et al. Oral silibinin inhibits in vivo human bladder tumor xenograft growth involving downregulation of survivin. 2008, *Clin Cancer Res*, 14, 300-308
- Singh S, Aggarwal BB. Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane). 1995, *J Biol Chem*, 270, 24995-25000
- Singletary K. Oregano overview of the literature on health benefits. 2010, *Nutr Today*, 45 (3), 129-138
- Slamenova D, Horvathova E, Sramkova M, et al. DNA-protective effects of two components of essential plant oils carvacrol and thymol on mammalian cells cultured in vitro. 2007, *Neoplasma*, 54, 108-112
- Soliman KF, Mazzeo EA. In vitro attenuation of nitric oxide production in C6 astrocyte cell culture by various dietary compounds. 1998 *Proc Soc Exp Biol Med*, 218 (4), 390-397
- Spitz DR, Sim JE, Ridnour LA, et al. Glucose deprivation-induced oxidative stress in human tumor cells. A fundamental defect in metabolism? 2000, *Ann N Y Acad Sci*, 899, 349-62
- Stamatis G, Kyriazopoulos P, Golegou S, et al. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of Greek herbal medicines. 2003, *J Ethnopharmacol*, 88, 175-179
- Stamatis G, Kyriazopoulos P, Golegou S, et al. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of Greek herbal medicines. 2003, *J Ethnopharmacol*, 88 (2-3), 175-179
- Staniforth V, Chiu LT, Yang NS. Caffeic acid suppresses UVB radiation-induced expression of interleukin-10 and activation of mitogenactivated protein kinases in mouse. 2006, *Carcinogenesis*, 27, 1803-1811
- Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment. 2003, *Trends Pharmacol Sci*, 24, 96-102
- Suganuma H, Kuzuhara T, Yamaguchi K, et al. Carcinogenic role of tumor necrosis factor- α inducing protein of *Helicobacter pylori* in human stomach. 2006, *J Biochem Mol Biol*, 39 (1), 1-8
- Suhaj M. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. 2006, *J Food Compos Anal*, 19, 531-537
- Sun NJ, Woo SH, Cassady JM, et al. DNA polymerase and topoisomerase II inhibitors from *Psoralea corylifolia*. 1998, *J Nat Prod*, 61, 362-366
- Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. 2003, *Nat Rev Cancer*, 3, 768-780

- Surh YJ. NF- κ B and Nrf2 as potential chemopreventive targets of some anti-inflammatory and antioxidative phytonutrients with anti-inflammatory and antioxidative activities. 2008, *Asia Pac J Clin Nutr*, 17(1), 269-272
- Syed DN, Khan N, Afaq F, et al. Chemoprevention of Prostate Cancer through Dietary Agents: Progress and Promise. 2007, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 16, 2193-2203
- Szatrowski TP, Nathan CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. 1991, *Cancer Res*, 51, 794-798
- Takeuchi H, Lu ZF, Fujita T. A new antioxidative 1,3-benzodioxole from *Melissa officinalis*. 2004, *Biosci Biotechnol Biochem*, 68 (5), 1131-1134
- Talpur N, Echard B, Ingram C, et al. Effects of a novel formulation of essential oils on glucose-insulin metabolism in diabetic and hypertensive rats: a pilot study. 2005, *Diabetes Obes Metab*, 7, 193-199
- Tamara P, Kondratyuk TP, Pezzuto JM. Natural product polyphenols of relevance to human health. 2004, *Pharm Biol*, 42 (1), 46-63
- Thorsen MA, Hildebrandt KS. Quantitative determination of phenolic diterpenes in rosemary extracts. Aspects of accurate quantification. 2003, *J Chromatogr A*, 995 (1-2), 119-125
- Toyokuni S, Okamoto K, Yodoi J, et al. Persistent oxidative stress in cancer. 1995, *FEBS Lett*, 358, 1-3
- Trichopoulou A, Lagiou P. Healthy traditional Mediterranean diet: an expression of culture, history, and lifestyle. 1997, *Nutr Rev*, 55, 383-389
- Tsai PJ, Tsai TH, Yu CH, et al. Evaluation of NO-suppressing activity of several Mediterranean culinary spices. 2007, *Food Chem Toxicol*, 45, 440-447
- Tsai SH, Lin-Shiau SY, Lin JK. Suppression of nitric oxide synthase and the downregulation of the activation of NF- κ B in macrophages by resveratrol. 1999, *Br J Pharmacol*, 126, 673-680
- Tsai TZ, Tsai TH, Chien YC, et al. In vitro antimicrobial activities against cariogenic streptococci and their antioxidant capacities: A comparative study of green tea versus different herbs. 2008, *Food Chem*, 110 (4), 859-864
- Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. 2010, *Nutr*, 2, 1231-1246
- Vagionas K, Graikou K, Ngassapa O, et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of three *Satureja* species growing in Tanzania. 2007, *Food Chem*, 103, 319-332
- Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. 2008, *Cancer Lett*, 267, 226-44

- Vinson JA. Flavonoids in foods as in vitro and in vivo antioxidants. 1998, *Adv Exp Med Biol*, 439, 151-164
- Visioli F, Bellomo G, Montedoro G, et al. Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. 1995, *Atherosclerosis*, 117, 25-32
- Visioli F, Galli C, Plasmati E, et al. Olive phenol hydroxytyrosol prevents passive smoking-induced oxidative stress. 2000, *Circulation*, 102, 2169-2171
- Watson AJ. Apoptosis and colorectal cancer. 2004, *Gut*, 53, 1701-1709
- Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C. Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules? 2004, *Free Rad Biol Med*, 36 (7), 838-849
- Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. 1996, *Biochem J*, 313, 17-29
- Wojdylo A, Oszmiński J, Czemerys R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. 2007 *Food Chem*, 105 (3), 940-949
- Wong CC, Li HB, Cheng KW, et al. A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. 2006, *Food Chem*, 97, 705-711
- Woo KJ, Jeong YJ, Inoue H, et al. Chrysin suppresses lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression through the inhibition of nuclear factor for IL-6 (NF-IL6) DNA-binding activity. 2005, *FEBS Lett*, 579, 705-711
- Xie K. Interleukin-8 and human cancer biology. 2001, *Cytokine Growth Factor Rev*, 12, 375-91
- Xiuzhen H, Tao S, Hongxiang L. Dietary polyphenols and their biological significance. 2007, *Int J Mol Sci*, 8, 950-988
- Yang CS, Maliakal P, Meng X. Inhibition of carcinogenesis by tea. 2002, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 42, 25-54
- Yeh CC, Kao SJ, Lin CC, et al. The immunomodulation of endotoxin-induced acute lung injury by hesperidin in vivo and in vitro. 2007a, *Life Sci*, 80, 1821-1831
- Yin F, Giuliano AE, Law RE, et al. Apigenin inhibits growth and induces G2/M arrest by modulating cyclin-CDK regulators and ERK MAP kinase activation in breast carcinoma cells. 2001, *Anticancer Res*, 21 (1A), 413-20
- Yoo K.M, Lee HC, Lee H, et al. Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. 2008, *Food Chem*, 106, 929-936
- Yoon JH, Baek, SJ. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. 2005, *Yonsei Med J*, 46 (5), 585-596
- Young DP, Hu Y, Leu RK, et al. Dietary fibre and colorectal cancer: a model for environment-gene interactions. 2005, *Mol Nutr Food Res*, 49, 571-84

- Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. 2009, Nat Rev Cancer, 9, 798-809
- Yu JQ, Lei JC, Zhang XQ, et al. Anticancer, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil of *Lycopus lucidus* Turcz. var. *hirtus* Regel. 2011, Food Chem, 126, 1593-1598
- Zaporozhets OA, Krushynska OA, Lipkovska NA, et al. A new test method for the evaluation of total antioxidant activity of herbal products. 2004, J. Agric Food Chem, 52, 21-25
- Zhang B, Wang ZF, Tang MZ, et al. Growth inhibition and apoptosis-induced effect on human cancer cells of toosendanin, a triterpenoid derivative from Chinese traditional medicine. 2005, Inv New Drugs, 23, 547-553
- Zhang Y, Ni J, Messing EM, et al. Vitamin E succinate inhibits the function of androgen receptor and the expression of prostate-specific antigen in prostate cancer cells. 2002, Proc Natl Acad Sci USA, 99, 7408-7413
- Zheng W, Wang SY. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. 2001 J. Agric Food Chem, 49 (11), 5165-5170
- Zheng W, Wang SY. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. 2001, J Agric Food Chem, 49, 5165-5170
- Zheng Y, Hu PA, Murphy DL, et al. Rapid gut transit time and slow fecal isoflavone disappearance phenotype are associated with greater genistein bioavailability in women. 2003, J Nutr, 133 (10), 3110-3116
- Bruneton J. Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. 1999, Paris: Technique & Documentation
- Duke JA. Handbook of medicinal herbs. 1985, CRC Press, Boca Raton
- Keys A, Keys M. How to eat well and stay well in the Mediterranean way. 1975, Doubleday
- Taiz L, Zeiger E. Plant Physiology. 2006, Sinauer Associates, 4th edition
- Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL. Βιοχημεία τόμος Ι. 2004, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης
- Σαββίδης. Το μαστιχόδενδρο της Χίου (*Pistacia lentiscus* var. *Chia*). 2000, Εκδοτικός οίκος Αδελφών Κυριακίδης Α.Ε