



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ-ΔΙΑΤΡΟΦΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Επίδραση αφεψημάτων των βοτάνων (Αντωναΐδα, Δίκταμο, Τσάι του βουνού, Φασκόμηλο, Φλισκούνη) στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου και του προστάτη

ΧΡΥΣΑΝΘΗ ΓΙΑΛΛΟΥΡΟΥ

A.M: 4421432



Τριμελής Επιτροπή

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Νικόλαος Καλογερόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής

ΜΕΛΗ: Ανδριάννα Καλιώρα, Επίκουρη Καθηγήτρια

Γεώργιος Δεδούσης Καθηγητής

Αθήνα 2016



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ-ΔΙΑΤΡΟΦΗ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Επίδραση αφεψημάτων των βοτάνων (Αντωναΐδα, Δίκταμο, Τσάι του βουνού, Φασκόμηλο, Φλισκούνη) στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου και του προστάτη

ΧΡΥΣΑΝΘΗ ΓΙΑΛΛΟΥΡΟΥ

A.M: 4421432



Τριμελής Επιτροπή

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Νικόλαος Καλογερόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής

ΜΕΛΗ: Ανδριάννα Καλιώρα, Επίκουρη Καθηγήτρια

Γεώργιος Δεδούσης Καθηγητής

Αθήνα 2016

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Εφαρμοσμένη Διαιτολογία Διατροφή» στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον κύριο Καλογερόπουλο, χωρίς την βοήθεια του οποίου η ολοκλήρωση αυτής της μελέτης θα ήταν αδύνατη, για το αμείωτο ενδιαφέρον και τη συμπαράσταση του, τόσο κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους όσο και κατά τη συγγραφή της.

Στην κύρια Καλιώρα οφείλω τις θερμές μου ευχαριστίες για την καθοδήγηση και την υποστήριξή της σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας μελέτης.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στον κύριο Δεδούση για την καθοδήγηση και τις συμβουλές του.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου για τις γνώσεις που μου πρόσφεραν.

Πολλές ευχαριστίες οφείλω στην Υποψήφια Διδάκτορα Δήμητρα Κογιάννου για τις συμβουλές της. Από την πρώτη στιγμή ήταν πρόθυμη να με βοηθήσει σε ό,τι χρειαζόμουν, να μου μεταδώσει τις γνώσεις της και με την βοήθεια της συνέβαλε στην ολοκλήρωση αυτής της μεταπτυχιακής διατριβής σε ευχάριστο και ζεστό κλίμα. Η φιλική στάση της, η υπομονή και η αγάπη της με βοήθησαν να διευρύνω τις γνώσεις μου στο εργαστηριακό τμήμα του αντικειμένου μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Χαρά Κουνδουράκη για την φιλική στάση και τις συμβουλές της. Η Χαρά ήταν πάντα δίπλα μου και με ενθάρρυνε όποτε συναντούσα δυσκολίες.

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

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον Δρ Χάρη Πρατσίνη ερευνητή στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», για την καθοδήγησή του και την καλή συνεργασία που συνετέλεσαν στο να ολοκληρωθεί η παρούσα εργασία

Τέλος, ευχαριστώ από καρδιάς, τους γονείς μου και τον αδερφό μου, χωρίς την ηθική και οικονομική στήριξη των οποίων δε θα είχα τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω τις μεταπτυχιακές μου σπουδές.

Σας ευχαριστώ!!!

Χ.Γ.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	7
Abstract.....	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	11
1.1. Φαρμακευτικά Φυτά – Βότανα.....	12
1.1.1. Γενικά Στοιχεία	12
1.1.2. Βότανα	13
1.2. Φυτοχημικά:	14
1.2.1. Κατηγορίες:	15
1.2.2. Πολυφαινόλες.....	15
1.2.3. Καροτενοειδή	25
1.2.4. Αλκαλοειδή- Τερπενοειδή.....	27
1.3. Βότανα	28
1.3.1. Αντωνάϊδα ή Τεύκριο (<i>Origanum Microphyllum</i>).....	28
1.3.2. Δίκταμο (<i>Origanum dictamus</i>)	30
1.3.3. Τσάι του βουνού (<i>Sideritis syriaca</i>)	32
1.3.4. Φασκόμηλο (<i>Salvia officinalis</i> L).....	34
1.3.5. Φλισκούνη (<i>Mentha pulegium</i>)	37
1.4. Καρκίνος.....	41
1.4.1. Καρκίνος του παχέος εντέρου	43
1.4.2. Καρκίνος του προστάτη.....	45
1.5. Στάδια του κυτταρικού κύκλου:.....	47
1.5.1.Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου	49
1.5.2. Τα στάδια του κυτταρικού κύκλου και καρκίνος.	50
1.6. Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος	50

1.6.1. Η επίδραση των φυτοχημικών στα στάδια του κυτταρικού κύκλου και στην απόπτωση.....	51
1.7. Ελεύθερες ρίζες – Αντιοξειδωτικά.....	54
1.7.1. Παραγωγή ελευθέρων ριζών	54
1.7.2. Δραστικές ενώσεις οξυγόνου και καρκίνος	56
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	58
2.1.Αφεψήματα βοτάνων	59
2.1.1. Παρασκευή και αφυδάτωση Αφεψημάτων Βοτάνων	59
2.1.2.Έλεγχος βιοδραστικότητας των αφεψημάτων	60
2.2. Κυτταρικές σειρές:	61
2.2.1.Καλλιέργεια κυττάρων.	61
2.2.2. Ψύξη και απόψυξη κυττάρων	64
2.3. Κυτταρομετρία ροής (FACS, Fluorescence-Activated Cell Sorting).....	64
2.4. Προσδιορισμός δραστικών ενώσεων οξυγόνου (reactive oxygen species,ROS) ...	67
2.5.Έλεγχος του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη μέθοδο MTT.	69
2.5.Στατιστική ανάλυση:	70
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	71
3.1. Η επίδραση των αφεψημάτων από βότανα στον κυτταρικό κύκλο και στην απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου και του προστάτη.....	72
3.2. Η επίδραση των αφεψημάτων από βότανα στις δραστικές ενώσεις οξυγόνου(ROS)	88
3.3. Επίλογος – Συμπέρασμα.....	100
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	102

Περίληψη

Η Μεσογειακή διατροφή έχει συγκεντρώσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, καθώς πλήθος επιδημιολογικών μελετών έχουν αναδείξει τα οφέλη της στην υγεία του ανθρώπου. Τρόφιμα που αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι αυτού του διατροφικού μοντέλου είναι τα αρωματικά φυτά, τα οποία απαντώνται στην βάση της Μεσογειακής Πυραμίδα με τη μορφή αφεψημάτων. Οι ευεργετικές ιδιότητες των αρωματικών φυτών έχουν αποδοθεί στο πλούσιο περιεχόμενό τους σε βιοδραστικά συστατικά, ενώ εντατικό πεδίο έρευνας αποτελεί η ανάδειξη της χημειοπροστατευτικής τους δράσης, σε διάφορες μορφές καρκίνου

Δεδομένου ότι, τα στοιχεία που έχουν συλλεχθεί για τα Ελληνικά βότανα, αναφορικά με τον μηχανισμό μέσω του οποίου επιδεικνύουν τη χημειοπροστατευτική τους δράση, είναι περιορισμένα, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν να εξετάσει την δυνατότητα των αφεψημάτων από Αντωναΐδα, Δίκταμο, Τσάι του βουνού, Φασκόμηλο, Φλισκούνι α) να προκαλούν *in vitro* αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού παρεμβαίνοντας σε στάδια του κυτταρικού κύκλου, β) να επάγουν την απόπτωση και γ) να επηρεάζουν τα επίπεδα οξειδωτικού στρες, σε καρκινικές σειρές του παχέος εντέρου (HT29) και του προστάτη (PC3).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι:

- τα αφεψήματα αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, παρεμβαίνοντας/μπλοκάροντας στην πλειοψηφία τους τη φάση S του κυτταρικού κύκλου
- η ικανότητά τους να επηρεάζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό εξαρτάται από τον τύπο καρκίνου, με τη μεγαλύτερη δράση να παρατηρείται στον καρκίνο του παχέος έντερου
- στα HT29 το αφέψημα από Δίκταμο παρουσίασε μεγαλύτερη αναστολή της φάσης S, ενώ ακολουθούν τα αφεψήματα από Αντωναΐδα, Φασκόμηλο, Τσάι βουνού και Φλισκούνι

- τα αφεψήματα από Φλισκούνι, Τσάι του βουνού, Δίκταμο, Φασκόμηλο επάγουν την απόπτωση στα HT29
- στα PC3, το αφέψημα από Φλισκούνι προκάλεσε την απόπτωση σε ποσοστό ανώτερο του 50%
- τα αφεψήματα των βοτάνων που μελετήθηκαν με εξαίρεση το Φλισκούνι για τα HT29 και την Αντωναΐδα για τα PC3 αυξάνουν τα ενδοκυττάρια επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) με δόσοεξαρτώμενο τρόπο και στους δυο τύπους καρκίνου
- στην εκδήλωση της χημειοπροστατευτικής δράσης των αφεψημάτων εμπλέκονται περισσότεροι μηχανισμοί πέρα από την μεταβολή των επιπέδων του οξειδωτικού στρες

Η επιβεβαίωση των ευρημάτων αυτών με *in vivo* πειράματα μπορεί να αναδείξει τα αφεψήματα από Αντωναΐδα, Δίκταμο, Τσάι του βουνού, Φασκόμηλο και Φλισκούνι ως λειτουργικά τρόφιμα της Μεσογειακής διατροφής που συμβάλλουν στην πρόληψη χρόνιων νοσημάτων.

Λέξεις κλειδιά: αφεψήματα, Αντωναΐδα, Δίκταμο, Τσάι του βουνού, Φασκόμηλο, Φλισκούνι, χημειοπροστασία, αντιοξειδωτικά, φυτοχημικά, καρκίνος

Abstract

The Mediterranean diet has drawn the interest of the scientific community as numerous epidemiological studies have highlighted its benefits on human health. Herbs are an integral part of this nutritional model, as they can be found at the basis of the Mediterranean pyramid in the form of beverages. The beneficial properties of herbs have been attributed to their rich content in bioactive ingredients, while their chemopreventive activity in various cancers constitutes an emergent and intensive field of research.

Given that the data collected so far on Greek herbs - in regards to the mechanisms through which they display their chemopreventive actions - are limited, the aim of this thesis was to examine the potential of beverages prepared from Cretan marjoram Dittany, Mountain tea, Sage and Pennyroyal a) to cause *in vitro* inhibition of cell proliferation by interfering with the cell cycle, b) to induce apoptosis and c) to influence the oxidative stress levels on tumor cell lines of the colon (HT29), and the prostate (PC3).

The results of this study showed that

- the beverages inhibit cell proliferation by interfering with / blocking the S phase.
- their ability to affect cellular proliferation is dependent on the type of cancer, with the more prominent effect being observed in colon cancer
- HT29 in the infusion of Dittany (*Origanum dictamnus*) showed greater inhibition of S phase, followed by the infusions of Cretan marjoram (*Origanum microphyllum*), Sage (*Salvia officinalis*), Mountain tea (*Sideritis syriaca*) and Pennyroyal (*Mentha pulegium*)
- the decoctions of Pennyroyal, Mountain tea, Dittany, Sage induce apoptosis in HT29
- to PC3, the infusion of Pennyroyal caused apoptosis in more than 50% compared to control

- the infusions of the herbs studied - except that of Pennyroyal for HT29 and that of Cretan marjoram for PC3 - increase the intracellular levels of reactive oxygen species (ROS) in a dose dependent manner in both types of cancer
- the chemopreventive action of the infusions involves several mechanisms beyond the alteration of oxidative stress levels

Confirmation of these findings by *in vivo* experiments can establish the infusions of Cretan marjoram, Dittany, Mountain tea, Sage and Pennyroyal as functional foods in the Mediterranean diet contributing to the prevention of chronic diseases.

Keywords: beverages, Cretan Marjoram, Dittany, Mountain Tea, Sage, Pennyroyal, chemoprevention, antioxidants, phytochemicals, cancer

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. Φαρμακευτικά Φυτά – Βότανα

1.1.1. Γενικά Στοιχεία

Η καλά ισορροπημένη διατροφή σε συνδυασμό με τακτική σωματική δραστηριότητα είναι ο ακρογωνιαίος λίθος της καλής υγείας. Η μη ισορροπημένη διατροφή μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, αυξημένη ευαισθησία σε ασθένειες, μειωμένη σωματική και διανοητική ανάπτυξη. (WHO, 2015).

Η παραδοσιακή Μεσογειακή διατροφή (MD) είναι κληρονομιά χιλιετιών, ανταλλαγή των πολιτισμών και των τροφίμων όλων των χωρών γύρω από τη Μεσόγειο. Ωστόσο στις μέρες μας, η παραδοσιακή Μεσογειακή διατροφή, σταδιακά διαβρώνεται λόγω του δυτικού τύπου διατροφής, της αστικής και τεχνολογικής ανάπτυξης, καθώς και της παγκοσμιοποίησης, της παραγωγής και της κατανάλωσης τροφίμων, που σχετίζονται με την ομογενοποίηση των συμπεριφορών απέναντι στα τρόφιμα.

Με βάση την μελέτη των Επτά Χωρών στη δεκαετία του 1950, γνωρίζουμε ποιες τροφές είχαν μεγαλύτερη ή μικρότερη συχνότητα κατανάλωσης στην περιοχή της Μεσογείου (Keys et al., 1986), ένα πρότυπο που ακολουθείται κυρίως σε φτωχές αγροτικές περιοχές (Trichopoulou, 2004). Η πρωτοποριακή μελέτη των Επτά Χωρών και οι πολυάριθμες και αυξανόμενες πρόσφατες επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες έχουν αποδείξει τα οφέλη για την υγεία που συνδέονται με την τήρηση του προτύπου Μεσογειακής διατροφής, κυρίως σε σχέση με τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης μεταβολικού συνδρόμου, διαβήτη τύπου 2, καρδιαγγειακών νοσημάτων, κάποιων νευροεκφυλιστικών ασθενειών και καρκίνων (Serra-Majem et al. 2006) (Sofi et al., 2008) (Benetou et al., 2008) (Meydani, 2005).

Η γραφική αναπαράσταση της Εικόνας 1.1 είναι ένα απλοποιημένο πλαίσιο πυραμίδας. Η Μεσογειακή πυραμίδα προτείνει καθημερινή κατανάλωση μπαχαρικών, βοτάνων, σκόρδου και κρεμμυδιών. Πρόκειται για έναν καλό τρόπο εισαγωγής ποικιλίας γεύσεων και νοστιμιάς στα πιάτα, που συμβάλλει, παράλληλα, στη μείωση της προσθήκης αλατιού (Bach-Faiga et al., 2011).

Mediterranean diet pyramid: a lifestyle for today
guidelines for adult population

Serving size based on frugality
and local habits
Wine in moderation
and respecting social beliefs



Εικόνα 1.1: Μεσογειακή πυραμίδα (Bach-Faiga et al., 2011).

1.1.2. Βότανα

Ο όρος “herbs” (βότανα) παραπέμπει κυρίως σε ποώδη φυτά, καθώς επίσης και στον φλοιό, τη ρίζα, τα φύλλα, τους σπόρους και τα άνθη τους (Kaliora & Kountouri, 2012). Τα βότανα χρησιμοποιούνται ως αρωματικές ουσίες και καρυκεύματα για τη διατήρηση και την αποθήκευση διαφόρων τροφίμων, για τη βελτίωση των κύριων οργανοληπτικών ιδιοτήτων τους, και για τη θεραπεία αρκετών ενοχλήσεων και παθήσεων. Ιδιαίτερα, η Μεσογειακή διατροφή διακρίνεται για την μεγάλη ποικιλία φαρμακευτικών βοτάνων. Το Φασκόμηλο, το Δίκταμο, το Τσάι του βουνού, η Αντωναΐδα, και το Φλισκούνη είναι ανάμεσα σε αυτά που θεωρούνται ενδημικά Μεσογειακά βότανα (Kogiannou et al., 2013). Ανέκαθεν οι άνθρωποι προσπαθούσαν να ανακαλύψουν ποιά φυτά θα μπορούσαν να είναι ευεργετικά για την ανθρώπινη υγεία ή ακόμα για την ανακούφιση του πόνου, των ενοχλήσεων ή την επούλωση των πληγών. Το NCI (Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου) έχει εξετάσει περισσότερα από 30.000 φυτά με αντικαρκινικές δράσεις (Ipek et al., 2005). Χημικά συστατικά που προέρχονται από ζώα, φυτά και μικροοργανισμούς έχουν χρησιμοποιηθεί για θεραπεία (Koehn & Carter, 2005) (Schmidt et al., 2008), ενώ τα προϊόντα που προέρχονται από φυτά έχουν κυριαρχήσει

στην ανθρώπινη φαρμακοποιία για πολλούς αιώνες και αποτελούν αστείρευτη πηγή για την Ιατρική. **(Schmidt et al., 2008)**.

Φαρμακευτικό φυτό (medicinal plant) είναι κάθε φυτό που περιέχει ένα ή περισσότερα δραστικά συστατικά, τα οποία έχουν την ικανότητα να προλαμβάνουν ή να ανακουφίζουν ασθένειες **(Srivastava et al., 1996)**. Οι γιατροί άρχισαν να βλέπουν τη χρήση των φαρμακευτικών βοτάνων ως «εναλλακτική λύση» σε άτομα που δεν έχουν δυνατότητα πρόσβασης σε επιστημονική υγειονομική περίθαλψη. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), το 70-95% του παγκόσμιου πληθυσμού στρέφεται στην παραδοσιακή ιατρική για την πρωτοβάθμια φροντίδα υγείας και οι περισσότερες από αυτές τις πρακτικές χρησιμοποιούν εκχυλίσματα φυτών ή άλλων φυσικών προϊόντων **(Sardesai, 2002) (Robinson & Zhang, 2011)**.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα βότανα που φαίνεται να έχουν σημαντική επίδραση στην πρόληψη ή τη διαχείριση καρδιαγγειακών ασθενειών, φλεγμονωδών διαταραχών και διάφορων τύπων καρκίνων **(Issa et al., 2006)**. Είναι γνωστό ότι μερικές φορές πολύπλοκα μείγματα ενώσεων από φαρμακευτικά φυτά έχουν μεγαλύτερη επίδραση από ότι οι μεμονωμένες ενώσεις, **(Castellanos et al., 2009)** ως αποτέλεσμα συνέργειας, ενίσχυσης της βιοδιαθεσιμότητας, συσσωρευτικών αποτελεσμάτων ή άλλων ιδιοτήτων των συστατικών, αλλά απαιτείται περαιτέρω έρευνα **(Williamson, 2001)**.

1.2. Φυτοχημικά:

Τα φυτοχημικά είναι βιοδραστικά συστατικά των φυτών χωρίς θερμιδική συνεισφορά, τα οποία έχουν ευεργετικά οφέλη για την υγεία **(Κατσιλάμπρος, 2010)**. Είναι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών και λειτουργούν ως άμυνα κατά των επιπτώσεων της υπερϊώδους ακτινοβολίας **(Beckman, 2000)**, ενώ έχουν προσελκυστική δράση για τους επικονιαστές, εντομοαπωθητική ή εντομοκτόνο δράση, αλληλοπαθητική δράση (εκλύονται από τις ρίζες ή από το φύλλωμα των φυτών και μπορούν να προκαλέσουν αναστολή της ανάπτυξης ή της αναπαραγωγής γειτονικών

φυτών), και βοηθούν την επικοινωνία με γειτονικά φυτά (Wink, 1987) (Taiz & Zeiger, 2006) (Dicke et al., 2003) (Preston et al., 2001) (Pare & Tumlinson, 1999).

Έρευνες δείχνουν τον επωφελή ρόλο των φυτοχημικών ενάντια στο καρκίνο, τη στεφανιαία νόσο, τον διαβήτη, την υψηλή αρτηριακή πίεση, τη φλεγμονή, τις μικροβιακές και ιογενείς λοιμώξεις, τα έλκη κ.λ.π. Η διερεύνηση των μηχανισμών δράσης τους βασίζεται σε μελέτες *in vitro* σε κυτταρικές καλλιέργειες, σε μελέτες σε ζώα με ασθένειες και σε επιδημιολογικές μελέτες σε ανθρώπους (Dillard & German, 2000).

1.2.1. Κατηγορίες:

Τα φυτοχημικά κατατάσσονται στις ακόλουθες πέντε βασικές κατηγορίες:

- Πολυφαινόλες (φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, κουμαρίνες, ταννίνες, σπιλβένια)
- Καροτενοειδή (α- και β- καροτένιο, λυκοπένιο, λουτεΐνη, ζεαξανθίνη, ασταξανθίνη)
- Αλκαλοειδή (αζωτούχες ενώσεις όπως, πυριδίνες, πουρίνες, κινολίνες, ισοκινολίνες, τερπενοειδή, στεροειδή)
- Θειούχες οργανικές ενώσεις (θειούχα αλλύλια, ινδόλες)
- Άλλες αζωτούχες ενώσεις

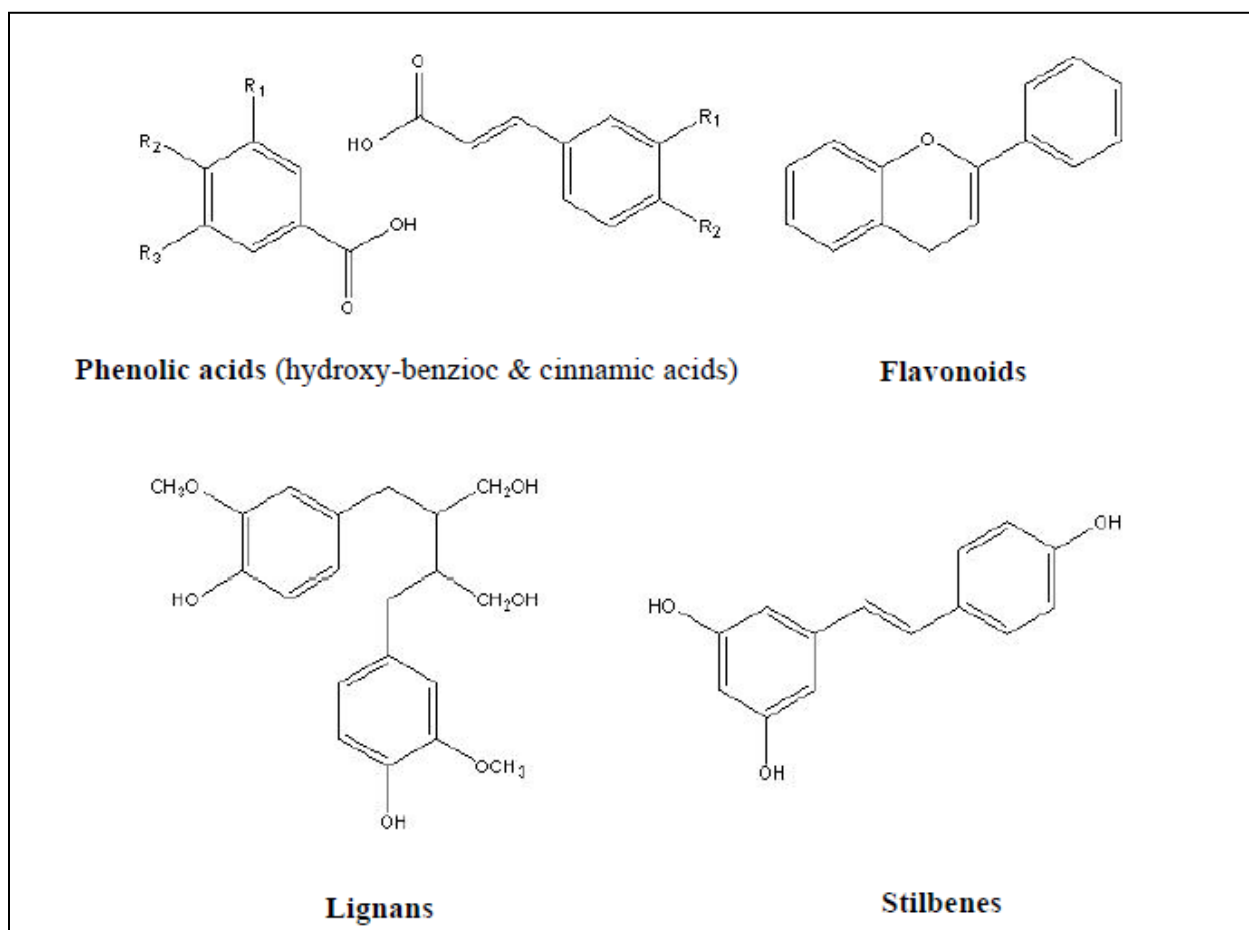
1.2.2. Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες των φυτών είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που είναι ευρέως διαδεδομένοι στα ανώτερα φυτά (Haslam, 1998) και εμπλέκονται σε διάφορες διεργασίες, όπως η αντίσταση κατά των παθογόνων παραγόντων, των αρπακτικών, και των περιβαλλοντικών πιέσεων (Duthie et al., 2003). Διακριτικά χαρακτηριστικά τους είναι η διαλυτότητα στο νερό και μοριακά βάρη που κυμαίνονται από 500 έως 4000 Da (Haslam, 1998). Έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερα από 10.000 πολυφαινολικά συστατικά σε διάφορα φυτά (Kondratyuk & Pezzuto, 2004).

1.2.2.1. Κατηγορίες πολυφαινολών:

Οι πολυφαινόλες διακρίνονται σε πέντε κατηγορίες: φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, σπιλβένια, κουμαρίνες, ταννίνες.

Τα φαινολικά οξέα διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: στα υδροξυ-βενζοϊκά οξέα και τα υδροξυκινναμικά οξέα. Στην κατηγορία των υδροξυβενζοϊκών οξέων ανήκουν το γαλλικό, το πρωτοκατεχικό, το βανιλλικό και το συριγγικό, ενώ στην κατηγορία των υδροξυκινναμικών οξέων κατατάσσονται τα π-κουμαρικό, φερουλικό, καφεϊκό, σιναπικό. Τα φλαβονοειδή διακρίνονται σε έξι κατηγορίες: τις φλαβονόλες (κερκετίνη, καμφερόλη, μυρισετίνη), τις φλαβόνες (απιγενίνη, χρυσίνη, λουτεολίνη), τις φλαβανόλες (κατεχίνη, επικατεχίνη, επιγαλλοκατεχίνη και ο γαλλικός εστέρας της, EGCG), τις φλαβονόνες (εσπεριτίνη, ναριγενίνη), τις ανθοκυανίνες (κυανιδίνη), τα ισοφλαβονοειδή (γενιστεΐνη).



Εικόνα 1.2. Χημικές δομές των κύριων κατηγοριών πολυφαινολών

Πολυφαινόλες υπάρχουν σε πολλά φυτά και τρόφιμα φυτικής προέλευσης, όπως τα φρούτα, τα λαχανικά, το τσάι, τα δημητριακά, τα εδώδιμα φαρμακευτικά φυτά και τα άγρια άνθη (Deng et al., 2013) (Guo et al., 2012) (Li et al., 2007) (Li & Chen, 2001) (Xia et al., 2011) (Fu et al., 2011) (Song et al., 2010) (Li et al., 2013) (Xia et al., 2011)

(Li et al., 2012). Τα λαχανικά είναι πλούσια σε πολυφαινόλες και αποτελούν σημαντικές πηγές πρόσληψης τους στην καθημερινή διατροφή. Σημαντικό φαινολικό περιεχόμενο βρέθηκε σε μαυρομάτικα φασόλια, κύμινο, λωτούς, γλυκοπατάτα, φασόλια σόγιας, φύλλα πιπεριού, φύλλα ginseng, και στο μπρόκολο **(Guo et al., 2012) (Deng et al., 2013)**. Οι πληθυσμοί που ακολουθούν τη Μεσογειακή διατροφή εμφανίζουν μειωμένο κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου λόγω της επαρκούς πρόσληψης ελαιολάδου και κόκκινου κρασιού, τα οποία έχουν σημαντική περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες **(Xia et al., 2010) (Carluccio et al., 2003)**.

Διάφοροι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τις συγκεντρώσεις και τις μορφές των πολυφαινολών στα τρόφιμα, όπως οι διαφορετικοί τύποι καλλιέργειας καθώς και ο βαθμός ωρίμανσης, η αποθήκευση, η επεξεργασία, η έκθεση στον ήλιο και τη βροχή, **(Gomez-Rico et al., 2006) (Bouaziz et al., 2004)**. Επίσης, οι μέθοδοι μαγειρέματος προκαλούν σημαντική μείωση στο περιεχόμενο των πολυφαινολών. Τα καρότα χάνουν σημαντικό ποσοστό των πολυφαινολών μετά τον βρασμό, ενώ το μαγείρεμα στον ατμό και το τηγάνισμα είχαν λιγότερο αρνητική επίδραση **(Ferracane et al., 2008) (Miglio et al., 2008)**.

Οι έρευνες δείχνουν ότι η βιοδιαθεσιμότητα πολλών προστατευτικών ενώσεων ενισχύεται όταν τα λαχανικά μαγειρεύονται **(Gliszczyńska-Swigło et al., 2006)**. Η αποθήκευση επηρέασε επίσης την περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες. Μετά από 11 μήνες αποθήκευσης, το περιεχόμενο των φαινολικών οξέων μειώθηκε κατά 5% έως 21% σε χυμό μήλου **(Gliszczyńska-Swigło & Tyrakowska, 2003)**. Μείωση στην περιεκτικότητα του ελεύθερου π-κουμαρικού οξέος παρατηρήθηκε σε κατεψυγμένα κόκκινα βατόμουρα. **(Mullen et al., 2002)** Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου μειώθηκαν μετά από οκτώ μήνες αποθήκευσης σε κλειστές φιάλες στο σκοτάδι, μείωση που αποδίδεται στην απώλεια των φαινολικών ενώσεων. **(Lavelli et al., 2006)**

1.2.2.2. Βιολογικές δράσεις των πολυφαινολών

Οι πολυφαινόλες έχουν βιολογικές δραστηριότητες και ωφέλειες στην υγεία για πρόληψη και θεραπεία των ασθενειών που σχετίζονται με γήρανση, καρκίνο και ασθένειες της καρδιάς (**Vaher et al., 2005**).

Αντιοξειδωτική δράση

Μεταξύ των αξιοσημείωτων βιολογικών δράσεων των φαινολικών ενώσεων, έχουν μελετηθεί ευρέως οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένης της δέσμευσης των ελευθέρων ριζών, αναστολής της οξείδωσης των λιπιδίων, μείωσης σχηματισμού υδροϋπεροξειδίων κ.λ.π. (**Sato et al., 1996**). Οι πολυφαινόλες μπορούν επίσης να λειτουργούν ως αντιοξειδωτικά στο πλάσμα, στις κυτταρικές μεμβράνες και στους παράγοντες μεταγραφής.

Το πράσινο τσάι περιέχει αφθονία από πολυφαινόλες, όπως κατεχίνη, επικατεχίνη και γαλλικό οξύ. Μια τυχαίοποιημένα διασταυρούμενη μελέτη κατέδειξε την αντιοξειδωτική δράση του πράσινου τσαγιού και την γραμμική συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας του πράσινου τσαγιού σε αντιοξειδωτικά και της έκτασης της αντιοξειδωτικής δράσης του *in vivo* (**Pecorari et al., 2010**).

Οι πολυφαινόλες μπορούν επίσης να λειτουργήσουν ως αντιοξειδωτικά μέσω των επιδράσεων τους στις μεμβράνες. Εκτός από την προστασία των μεμβρανών, αρκετές φαινολικές ενώσεις, όπως επικατεχίνη, πρωτοκατεχικό οξύ, προπυλικός εστέρας του γαλλικού οξέος, βανιλλικό οξύ, κερκετίνη, μυρισετίνη, επικατεχίνη, επιγαλλοκατεχίνη, γαλλικός εστέρας της επιγαλλοκατεχίνης και γαλλικό οξύ αναστέλλουν τις βλάβες στο DNA (**Perron et al., 2011**).

Οι πολυφαινόλες μπορούν να χρησιμοποιηθούν όχι μόνο ως αντιοξειδωτικά για τον άνθρωπο αλλά και ως συντηρητικά στη βιομηχανία τροφίμων (**Sun et al., 2010**). Τα φλαβονοειδή μπορεί να αποτρέψουν τις βλάβες που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες με τους ακόλουθους μηχανισμούς:

(1) άμεση δέσμευση των δραστικών ενώσεων οξυγόνου (ROS) (**Procházková et al., 2011**).

- (2) ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών ενζύμων **(Nijveldt et al., 2001)**.
- (3) σχηματισμό συμπλόκων με προοξειδωτικά μέταλλα **(Ferrali et al., 1997)**.
- (4) αναστολή των οξειδασών **(Heim et al., 2002) (Cos et al., 1998)**.
- (5) μείωση του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από το μονοξείδιο του αζώτου **(van Acker et al., 1995)**.
- (6) αύξηση των επιπέδων ουρικού οξέος **(Lotito & Frei, 2006)**.
- (7) αύξηση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων **(Yeh et al., 2005)**.

Πολυφαινόλες	Αντιοξειδωτική δράση	Βιβλιογραφία
Εκχύλισμα σταφυλιού πλούσιο σε πολυφαινόλες	Μειώνει το οξειδωτικό στρες στον ορό	(Garcia-Alonso et al., 2006)
Εκχύλισμα σπόρων σταφυλιού	Μείωση της οξείδωσης της LDL χοληστερόλης στο πλάσμα	(Sano et al., 2007)
Αιθανολικό εκχύλισμα σταφυλιών Chardonnay	Συντηρητικό για ψάρια και ιχθυέλαια	(Luther et al., 2007)
(-) – Επικατεχίνη και Προκυανιδίνη	Συντηρητικό για φρούτα	(Sun et al., 2010)
Υδροξυτυροσόλη και παράγωγά της	Μειώνουν την οξείδωση της LDL στο πλάσμα και επηρεάζει βιοδείκτες οξειδωτικής βλάβης.	(Raederstorff, 2009)
Κατεχίνη, Επικατεχίνη και Γαλλικό οξύ	Προκαλούν ανάλογα με την δόση επιπτώσεις στην αντιοξειδωτική δράση στο πλάσμα	(Pecorari et al., 2010)
Ανθοκυανίνες	Δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες	(Deng et al., 2013)
Εκχύλισμα από καρύδια και αμύγδαλα	Μείωση της υπεροξειδωσής των λιπιδίων στο πλάσμα	(Torabian et al., 2009)
Καρνοσικό οξύ,	Προστατεύουν τις	(Perez-Fons et al., 2010)

Καρνοσόλη, Ροσμαδιάλη, Γενκουανίνη, Ροσμαρινικό οξύ	μεμβράνες από οξειδωτική καταστροφή	
---	--	--

Πίνακας 1.1. Αντιοξειδωτικές δράσεις πολυφαινόλων

Καρδιοπροστατευτική δράση

Η μεταγευματική υπερλιπιδαιμία και το οξειδωτικό στρες είναι καλά αποδεδειγμένος παράγοντας κινδύνου για αθηροσκλήρωση, που θα μπορούσε να μειωθεί με τις πολυφαινόλες **(Vita, 2005)**.

Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι οι διαιτητικές πολυφαινόλες θα μπορούσαν να μειώσουν τον κίνδυνο για θρόμβωση, η οποία είναι μία από τις κύριες αιτίες για το έμφραγμα του μυοκαρδίου, την ισχαιμική καρδιοπάθεια, κ.τ.λ. **(Santhakumar et al., 2015) (Santhakumar et al., 2013) (Singh et al., 2008)**. Τα φλαβονοειδή φαίνεται να έχουν αντιισχαιμική δράση **(Duthie et al., 2000) (Mladěnka et al., 2010) (Rump et al., 1995)**. Τα ευεργετικά αποτελέσματα των φρούτων και των λαχανικών έχουν σε μεγάλο βαθμό αποδοθεί στις πολυφαινόλες που περιέχουν, δεδομένου ότι η κατανάλωση τροφών πλούσιων σε πολυφαινόλες από ανθρώπους και πειραματόζωα συνοδεύεται από μείωση: i) της δυσλιπιδαιμίας και της αθηροσκλήρωσης ii) της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας και υπέρτασης iii) της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και της θρόμβωσης iv) της φλεγμονώδους διεργασίας που σχετίζεται με την επαγωγή και διαίونيση της καρδιαγγειακής νόσου **(Dohadwala & Vita, 2009) (Bertelli & Das, 2009) (Corti et al., 2009) (Desch et al., 2010) (Galleano et al., 2009)**.

Οι καρδιοπροστατευτικές επιδράσεις του κόκκινου κρασιού αποδόθηκαν στην υψηλή περιεκτικότητά του σε αντιοξειδωτικά φαινολικά, συμπεριλαμβανομένης της ρεσβερατρόλης και των προανθοκυανιδινών. Η ρεσβερατρόλη είναι μια πολυφαινόλη που βρίσκεται σε αφθονία στα σταφύλια και στο κρασί **(Deng et al., 2012)**. Επιπλέον, ο Samuel και οι συνεργάτες του έχουν δείξει ότι το λευκό κρασί είναι εξίσου καρδιοπροστατευτικό όπως το κόκκινο, επειδή περιέχει και άλλες ενώσεις όπως τα υδροξυκινναμικά οξέα (καφεϊκό οξύ) και μονοφαινόλες (τυροσόλη) **(Samuel, et al., 2008)**.

Χημειοπροστατευτική δράση των πολυφαινολών

Έχουν παρατηρηθεί δράσεις των πολυφαινολών κατά του καρκίνου του στόματος, του στομάχου, του δωδεκαδακτύλου, του παχέος έντερου, του ήπατος, του πνεύμονα, του στήθους ή του δέρματος. Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες με πολλές πολυφαινόλες όπως προανθοκυανιδίνες, φλαβονοειδή, ρεσβερατρόλη, ταννίνες, γαλλικό εστέρα της επιγαλλοκατεχίνης, γαλλικό οξύ και ανθοκυανίνες. Όλες έδειξαν χημειοπροστατευτικές δράσεις σε ορισμένα μοντέλα, αν και οι μηχανισμοί δράσης τους βρέθηκαν να διαφέρουν **(Johnson et al., 1994) (Formica & Regelson, 1995)**.

Οι προανθοκυανιδίνες δρουν χημειοθεραπευτικά εναντίον του καρκίνου του μαστού, συμπεριλαμβανομένης της αναστολής της μετάστασης **(Mantena et al., 2006)**. Τα μούρα είναι πλούσια σε ανθοκυανίνες, οι οποίες διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα θεραπευτικών και χημειοπροστατευτικών ιδιοτήτων. Μελέτη με έξι εκχυλίσματα μούρων δείχνει ότι προκάλεσαν σημαντική αναστολή των H_2O_2 - και του TNF- α , που επάγει την έκφραση των αυξητικών παραγόντων των ενδοθηλίων **(Bagchi et al., 2004)**. Υπάρχουν πολλά αποδεικτικά στοιχεία που στηρίζουν την συσχέτιση μεταξύ της πρόσληψης πολυφαινολών από το πράσινο τσάι και τον μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου. Το πράσινο τσάι μπορεί να έχει προστατευτική επίδραση ενάντια στον καρκίνο του προστάτη **(Davalli et al., 2012)**.

Τα βιοδραστικά συστατικά, τα οποία είναι άφθονα στο πράσινο τσάι είναι η κατεχίνη, ο γαλλικός εστέρας της επιγαλλοκατεχίνης και η επιγαλλοκατεχίνη, και δρουν ως επαγωγείς θανάτου των καρκινικών κυττάρων **(Landis-Piwowar et al., 2007)**. Το γαλλικό οξύ μπορεί επίσης να εμποδίσει την καρκινογένεση του παχέος εντέρου μέσω της αναστολής της βλάβης του DNA **(Giftson et al., 2010)**. Εκτός από το γαλλικό οξύ και οι φλαβόνες θα μπορούσαν να αποτρέψουν την καρκινογένεση του παχέος εντέρου **(Wenzel et al., 2000)**. Οι φλαβόνες βρέθηκε ότι μειώνουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HT-29 και επάγουν ισχυρά τη διαφοροποίηση καθώς και την απόπτωση. Τα φλαβονοειδή επάγουν την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων **(Wenzel et al., 2000)**.

Πολυφαινόλες	Επιδράσεις	Βιβλιογραφία
Προανθοκυανιδίνες	Αναστολή της μετάστασης του καρκίνου του μαστού	(Mantena et al., 2006)
Ανθοκυανίνες	Επισκευή/προστασία της ακεραιότητας του DNA και καθυστέρηση της ανάπτυξης των αιμοφόρων αγγείων σε ορισμένους όγκους	(Bagchi et al., 2004)
Γαλλικός εστέρας της επιγαλλοκατεχίνης-3	Αναστολή του πρωτεασώματος και του κυτταρικού θανάτου του όγκου Προλαμβάνει το καρκίνο του προστάτη	(Davalli et al., 2012)(Landis-Piwowar et al., 2007)
Γαλλικό οξύ	Πρόληψη της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου μέσω αναστολής της καταστροφής του DNA	(Giftson et al., 2010)
2-Φαινυλ-4H-1-βενζοπυραν-4-όνη	Πρόκληση απόπτωσης	(Wenzel et al., 2000)
Ρεσβερατρόλη	Αναστολή κάθε σταδίου της πολυσταδιακής καρκινογένεσης καρκινικών κυττάρων του προστάτη	(Stewart et al., 2003)
Ελλαγιταννίνες	Πρόκληση απόπτωσης σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές όγκου του στόματος	(Yoshida et al., 2000)

Πίνακας 1.2. Αντικαρκινικές δράσεις των πολυφαινολών

Αντιφλεγμονώδεις δράσεις

Η χρόνια φλεγμονή θεωρείται βασικός παράγοντας σε πολλές ασθένειες του ανθρώπου, συμπεριλαμβανομένης της παχυσαρκίας, του διαβήτη τύπου II, των καρδιαγγειακών νοσημάτων, των νευροεκφυλιστικών ασθενειών και της γήρανσης. Οι πολυφαινόλες έχουν δείξει σημαντικές αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις *in vivo* και *in vitro* (Santangelo et al., 2007) (Subarnas & Wagner, 2000) (Widlansky et al., 2005).

Οι μεταβολίτες των πολυφαινολών που προέρχονται από τη μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου φαίνεται ότι έχουν αντι-φλεγμονώδη δράση και μπορούν να αναστείλουν περισσότερο από το 50% της παραγωγής της προσταγλανδίνης E-2 (Larrosa et al., 2009). Οι Martinez-Dominguez και συνεργάτες έδειξαν ότι το παρθένο ελαιόλαδο με υψηλότερο περιεχόμενο σε πολυφαινόλες επέδρασε προστατευτικά στη φλεγμονή. (Martinez-Dominguez et al., 2001). Η πρόσληψη των πολυφαινολών του πράσινου τσαγιού οδήγησε σε μείωση των επιπέδων των δεικτών φλεγμονής και των προφλεγμονωδών κυτοκινών σε χρονίως εκτεθειμένο δέρμα σε UVB και σε δέρμα με όγκους σε ποντίκια άγριου τύπου (Meeran et al., 2009). Οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις των κατεχινών, που είναι άφθονες στο πράσινο τσάι ενεργοποιούνται μέσω μιας ποικιλίας διαφορετικών μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένης της διαμόρφωσης των ισομόρφων της σύνθεσης του νιτρικού οξειδίου.

Οι πολυφαινόλες μπορεί να επηρεάσουν την αγγειακή φλεγμονή και τη βλάβη, όχι μόνο ως αντιοξειδωτικά, αλλά και ως ρυθμιστές των φλεγμονωδών σηματοδοτικών μονοπατιών οξειδοαναγωγής (Kostyuk et al., 2011) (Vauzour, et al., 2010).

Αντιμικροβιακές δράσεις:

Οι πολυφαινόλες έχει αποδειχθεί ότι έχουν αντιβακτηριδιακή, αντιμυκητιασική και αντιϊκή δράση (Baydar et al., 2006) (Chavez et al., 2006) (Jung et al., 2005) ενώ τα φλαβονοειδή έχουν αντιϊκή και αντιβακτηριδιακή δράση (Weber et al., 2003) (Alvesalo et al., 2006). Η αποσταθεροποίηση της εξωτερικής μεμβράνης των Gram-αρνητικών μικροοργανισμών, όπως επίσης και οι αλληλεπιδράσεις της κυτταρικής μεμβράνης θα μπορούσαν να είναι ένας από τους μηχανισμούς πίσω από την αντιβακτηριδιακή δράση (Plumed-Ferrer et al., 2013).

Οι πολυφαινόλες του τσαγιού έδειξαν αντιβακτηριακή δράση έναντι του *Bacillus stearothermophilus*. Η αντοχή στη θερμότητα των σπορίων *Bacillus stearothermophilus* και σπορίων του *Clostridium thermoaceticum* μειώθηκαν με την προσθήκη πολυφαινολών του τσαγιού. Η επιγαλλοκατεχίνη, η οποία είναι το κύριο συστατικό των πολυφαινολών τσαγιού, έδειξε ισχυρή δραστηριότητα έναντι τόσο του *Bacillus stearothermophilus*, όσο και του *Clostridium thermoaceticum* (**Sakanaka et al., 2000**).

Οι πολυφαινόλες ήταν σε θέση να καταστείλουν μια σειρά μικροβιακών παθογόνων παραγόντων, μέσω της μείωσης των υποδοχέων προσκόλλησης, της αναστολής σχηματισμού βιομεμβρανών, της εξουδετέρωσης των βακτηριακών τοξινών και της συνέργειας με τα αντιβιοτικά (**Daglia, 2012**).

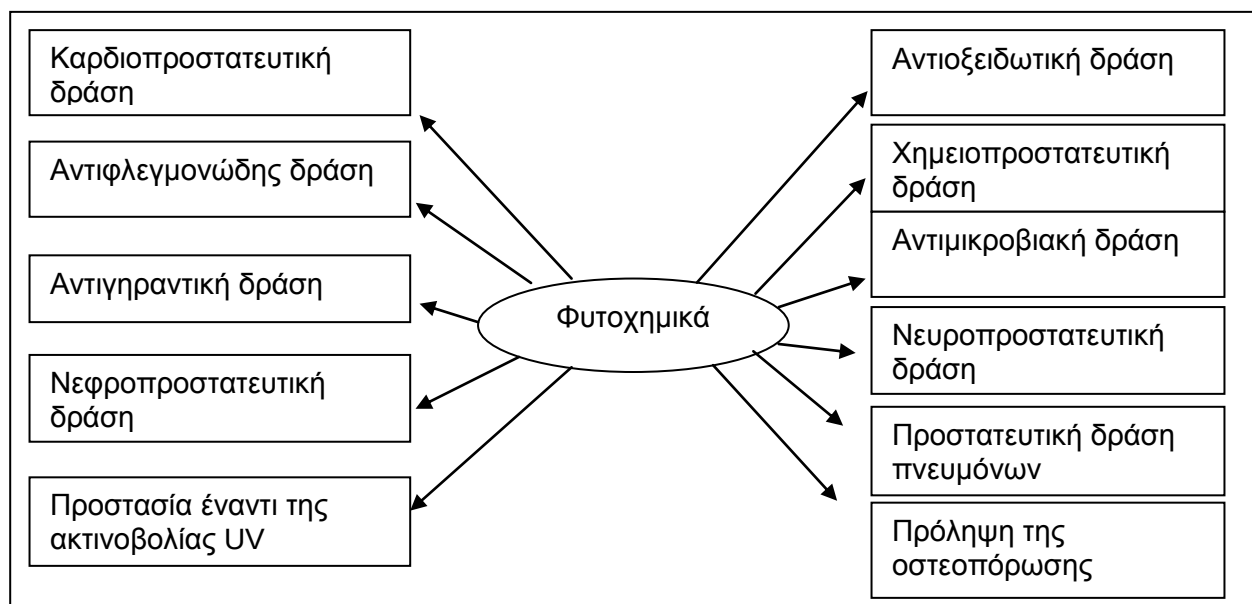
Αντιγηραντικές δράσεις

Η αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών, μπορεί να είναι χρήσιμη για την αναστροφή της πορείας της γήρανσης. Το εκχύλισμα σπόρων σταφυλιού έχει ανασταλτική δράση επί της συσσώρευσης οξειδωτικών βλαβών του DNA στον νωτιαίο μυελό, που σχετίζονται με την ηλικία, καθώς και σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου όπως τον εγκεφαλικό φλοιό, το ραβδωτό σώμα και τον ιππόκαμπο (**Balu et al., 2006**). Έχουν αποδειχθεί οι νευροπροστατευτικές ιδιότητες του εκχυλίσματος πράσινου τσαγιού και του γαλλικού εστέρα της επιγαλλοκατεχίνης (EGCG) σε μοντέλα ποντικών με νόσο Parkinson (**Levites et al., 2001**). Επιπρόσθετα, οι πολυφαινόλες από πίτουρο αραβοσίτου και το φερουλικό οξύ αναφέρθηκαν επίσης ως επωφελείς στη νόσο του Alzheimer (**Rossi et al., 2008**).

Άλλες βιολογικές δράσεις των πολυφαινολών.

Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι πολυφαινόλες όπως αυτές του πράσινου τσαγιού δρουν προστατευτικά στη βλάβη του δέρματος, και την υπεροξειδωση των λιπιδίων από την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία (**Meeran et al., 2009**), (**Kim et al., 2001**) Έχει επίσης αναφερθεί η προστασία των νεφρών από πολυφαινόλες (**Rodrigo & Bosco, 2006**) και συνδέεται συχνά με τη χρόνια κατανάλωση κόκκινου κρασιού (**Rodrigo et al., 2011**).

Εκτός από τους νεφρούς, οι πολυφαινόλες μπορούν να προστατεύσουν έναντι της αποφρακτικής πνευμονικής νόσου. Η υψηλή πρόσληψη ισοφλαβονών σόγιας και γενιστεΐνης φαίνεται να σχετίζεται με καλύτερη πνευμονική λειτουργία σε ασθενείς με άσθμα (**Woods et al., 2003**). Η ινσουλινοαντίσταση, ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα των μεταβολικών διαταραχών, είναι ένας παράγοντας κινδύνου για τον διαβήτη και την καρδιαγγειακή νόσο. Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι πολυφαινόλες, όπως η ρεσβερατρόλη και ο γαλλικός εστέρας της επιγαλλοκατεχίνης, *in vivo* έχουν ευεργετικές επιδράσεις στο μεταβολισμό της και την αντίσταση στην ινσουλίνη (**Dasgupta & Milbrandt, 2007**) (**Meydani & Hasan, 2010**). Το συμπλήρωμα της επιγαλλοκατεχίνης βελτιώνει την ανοχή γλυκόζης, την ευαισθησία στην ινσουλίνη, και την λειτουργία του ενδοθηλίου (**Tsanga et al., 2005**). Η κατανάλωση γενιστεΐνης, νταϊζεΐνης ή γλυκοζιτών τους, για αρκετές εβδομάδες θα μπορούσε να αποτρέψει την μείωση της οστικής πυκνότητας (**Pandey & Rizvi, 2009**).



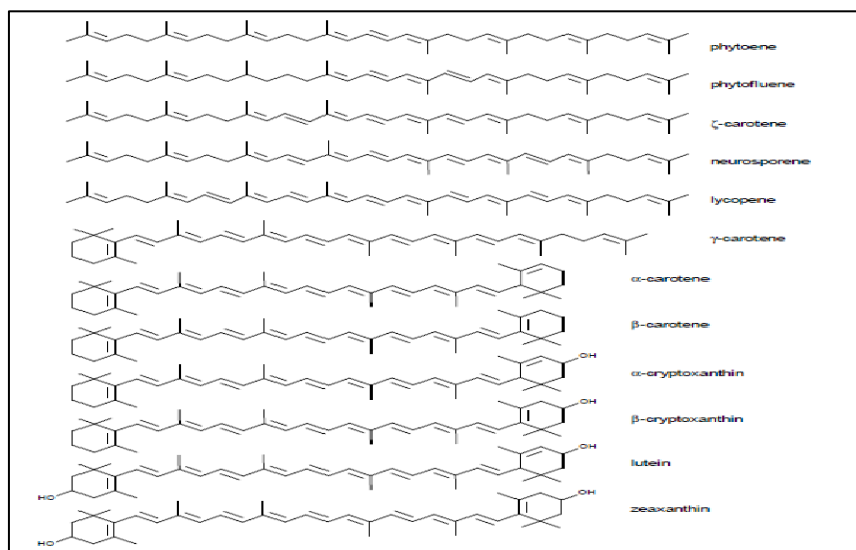
Εικόνα 1.3. Μερικές από τις βιολογικές δράσεις των φυτοχημικών

1.2.3. Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή είναι ζωτικής σημασίας συστατικό της διατροφής θηλαστικών, καθώς παρέχει τις πρόδρομες ουσίες για τη βιοσύνθεση της βιταμίνη Α (**von Lintig, 2010**). Τα καροτενοειδή είναι ισοπρενοειδή μόρια που είναι ευρέως διαδεδομένα στη

φύση και συνήθως θεωρούνται χρωστικές στα φρούτα, στα λουλούδια και στα μαλακά όστρακα. Τα ζώα δεν είναι σε θέση να συνθέσουν καροτενοειδή *de novo* και στηρίζονται στη διατροφή ως πηγή αυτών των ενώσεων. Τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί σημαντικό ενδιαφέρον για τα φυτικά καροτενοειδή σε σχέση με τις δυνατότητες τους να ανακουφίζουν ασθένειες που σχετίζονται με την γήρανση (Fraser & Bramley, 2004).

Τα καροτενοειδή στην ανθρώπινη διατροφή προέρχονται κυρίως από τις ρίζες, τα φύλλα, τους βλαστούς, τους σπόρους και τα φρούτα από καλλιεργούμενα φυτά. Σε μικρότερο βαθμό, τα καροτενοειδή προσλαμβάνονται από αυγά, πουλερικά και ψάρια, όταν στις ζωοτροφές έχουν προστεθεί προϊόντα από φυτά ή φύκη, π.χ. η ζεαξανθίνη από αραβόσιτο στην τροφή των πουλερικών.



Εικόνα 1.4. Η χημική δομή των καροτενοειδών

Μια έρευνα για την πρόσληψη καροτενοειδών στην Ευρώπη αποκάλυψε σημαντικές διαφορές στις κύριες διατροφικές πηγές των καροτενοειδών μεταξύ των χωρών (O'Neill et al., 2001).

Μέχρι σήμερα, έχουν καταγραφεί περισσότερα από 700 καροτενοειδή

(Britton et al., 2004). Τα πιο σημαντικά είναι το β-καροτένιο, α-καροτένιο, λυκοπένιο, λουτεΐνη, ζεαξανθίνη, β-κρυπτοξανθίνη, α-κρυπτοξανθίνη, γ-καροτένιο, όλα στο ανθρώπινο πλάσμα (Εικόνα 1.4.) (Khachik, 2006) (Breecher & Khachik, 1992).

1.2.2.1. Βιολογικές δράσεις των καροτενοειδών

Τα καροτενοειδή και μερικοί από τους μεταβολίτες τους φαίνεται να παίζουν προστατευτικό ρόλο σε έναν αριθμό διαταραχών που σχετίζονται με τις ελεύθερες ρίζες, όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις, διάφοροι τύποι καρκίνου ή

νευρολογικές ασθένειες, καθώς και φωτοευαισθησία ή οφθαλμολογικές διαταραχές **(Fiedor & Burda, 2014) (Fraser & Bramley, 2004)**. Ο πιθανός χημειοπροστατευτικός ρόλος των καροτενοειδών, καθώς και άλλες αντικαρκινογόνες, αντιμεταλλαξογόνες και αντιοξειδωτικές ιδιότητες έχει υποστηριχτεί από πολλές επιδημιολογικές μελέτες **(Marques-Vidal et al., 2006) (Vainio, 2006)**.

Θετική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ της κατανάλωσης φρούτων και λαχανικών πλούσιων σε καροτενοειδή και του μειωμένου κινδύνου από διάφορους τύπους καρκίνου **(Block et al., 1992) (Voorrips et al., 2000) (Donaldson, 2004) (Key, 2011)**. Τα καροτενοειδή, ως λιπόφιλα μόρια, αναμένεται να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικοί δεσμευτές των ελευθέρων ριζών εντός των υδρόφοβων κυτταρικών μεμβρανών και των λιποπρωτεϊνών, μειώνοντας την πιθανότητα της οξειδωσης των δομών της μεμβράνης και συνολικά τον κίνδυνο για νοσηρότητα **(Agarwal et al., 2012)**. Υπάρχει πιθανή συσχέτιση μεταξύ της υψηλής πρόσληψης φρούτων και λαχανικών πλούσιων σε καροτενοειδή και της μείωσης της νοσηρότητας και της θνησιμότητας από καρδιαγγειακές παθήσεις **(Alpha tocopherol Group, 1994)**.

1.2.4. Αλκαλοειδή- Τερπενοειδή

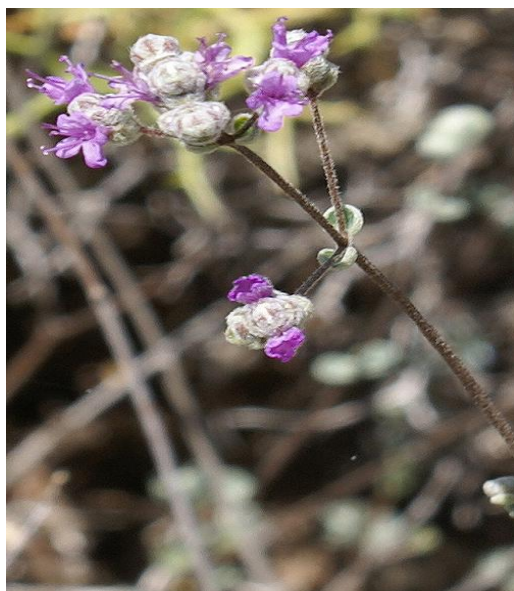
Τα τερπένια, επίσης γνωστά και ως ισοπρενοειδή, **(Harborne & Baxter, 1993)** είναι υδρογονάνθρακες φυτικής προέλευσης με ανθρακικό σκελετό ισοπρενίου $\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$ (2-μεθυλοβουταδιένιο1,3) ανοικτής αλύσου ή κυκλικό (μόνο- ή δικυκλικό). Ταξινομούνται ανάλογα με τον αριθμό ισοπρενικών ομάδων στο μόριό τους **(Wink et al., 2012)**. Τα τερπενοειδή αντιπροσωπεύουν τη μεγαλύτερη κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών και συνήθως δεν περιέχουν άζωτο ή θείο στις δομές τους. Πολλά τερπενοειδή χρησιμεύουν ως άμυνα κατά των μικροβιακών ενώσεων και των φυτοφάγων και / ή είναι μόρια σηματοδότησης για να προσελκύσουν έντομα επικοινωνιστές **(Wink et al., 2012)**.

1.3. Βότανα

Τα κύρια αρωματικά φυτά ανήκουν στα οικογένειες Labiatae (ή Lamiaceae), Umbelliferae, Lauraceae, Myrtaceae και Compositae (Kaliora et al., 2014).

1.3.1. Αντωναΐδα ή Τεύκριο (*Origanum Microphyllum*)

Το *Origanum microphyllum* είναι ένα φαρμακευτικό φυτό του γένους *Origanum* της οικογένειας Labiatae, ενδημικό της Κρήτης και κοινώς γνωστό ως «Αντωναΐδα» (Karousou, 1995) (Aligiannis et al., 2001) (Gotsiou et al., 2002).



Εικόνα 1.5. Αντωναΐδα (*Origanum Microphyllum*)

Σε μελέτη της Marelli και των συνεργατών της, το 2015, παρατηρήθηκε ότι τα αιθέρια έλαια από Αντωναΐδα είχαν αντιμικροβιακή δράση, ανέστειλαν το κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές και έδειξαν αντιοξειδωτική δράση (Marrelli et al., 2015).

Επίσης, αντιοξειδωτικές ιδιότητες αναφέρθηκαν και σε άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2014 (Tair et al., 2014). Οι Kogiannou και συνεργάτες προσδιόρισαν τα φαινολικά συστατικά και τα τερπενικά οξέα στο αφέψημα Αντωναΐδας (πίνακα 1.5.) (Kogiannou et al., 2013).

Συστατικά	Αφέψημα από Αντωναΐδα (μg/200ml)	
	Μέσος όρος	± τυπική απόκλιση
Φαινολικά οξέα		
α) υδροξυβενζοϊκά οξέα		
β - υδρόξυ βενζοϊκό οξύ	53.43	4.56
Βανιλλικό οξύ	37.37	2.53

Πρωτοκατεχικό οξύ	54.60	6.43
Συριγγικό οξύ	99.46	12.50
Γαλλικό οξύ	6.76	3.36
Π- υδροξυ- φαινυλοξικό οξύ	8.34	4.15
3,4-διυδροξύ-φαινυλοξικό οξύ	----	----
β) υδροξυκινναμικά οξέα		
κινναμικό οξύ	6.19	0.33
ο- Κουμαρικό οξύ	----	----
π- Κουμαρικό οξύ	10.89	5.42
Φερουλικό οξύ	29.88	0.88
Καφεϊκό οξύ	113.42	9.48
Σιναπτικό οξύ	22.45	0.11
Χλωρογενικό οξύ	23.46	1.87
Φλαβονοειδή		
Χρυσίνη	21.34	1.38
Επικατεχίνη	19.15	1.29
Ναριγενίνη	109.33	11.86
Κατεχίνη	29.85	0.85
Γενιστεΐνη	----	----
Καμφερόλη	19.44	0.12
Κερκετίνη	22.16	1.18
Τερπενοειδή φαινολικά		
Θυμόλη	6046	121.12
Καρβακρόλη	26274.0	324.87
Τερπενικά οξέα		
Ολεανολικό οξύ	14.49	0.27
Ουρσολικό οξύ	----	----
Συνολικά		
Απλές πολυφαινόλες	33013.65	316.96
Φαινολικά οξέα	243.84	10.57

Υδροξυκιναμμωμικά οξέα	197.04	14.94
Φλαβονοειδή	217.26	5.07
Τερπενικά φαινολικά	32355.5	286.38
Τερπενικά οξέα	14.49	0.27

Πίνακας 1.3. Φαινολικά συστατικά και τερπενικά οξέα σε αφέψημα Αντωνιάδας. (Kogiannou et al., 2013)

1.3.2. Δίκταμο (*Origanum dictamnus*)

Το *Origanum dictamnus* (Εικ.6) είναι ενδημικό είδος της Κρήτης, που συναντάται από το επίπεδο της θάλασσας μέχρι τα ψηλά βουνά. Ανήκει στην οικογένεια Labiatae (Fernandes et al., 1972).

Το «Δίκταμο της Κρήτης» ή «Δίκταμος» είναι γνωστό από την αρχαιότητα για τις ιατρικές εφαρμογές του, οι οποίες σχετίζονται με τους αρχαίους Έλληνες Θεούς και τη μυθολογία (Skrubis, 1979) (Thanos, 1994) (Baumann, 1996). Είναι ένας μικρός θάμνος με ύψος περίπου 35 cm (Ietswaart, 1980). Το Δίκταμο συλλέγεται κατά την αρχή του καλοκαιριού (Fragaki, 1969). Χρησιμοποιείται ως μαγειρικό και ως φαρμακευτικό φυτό, ως τονωτικό και ενισχυτικό της πέψης, (Simon et al., 1984) (Bown, 2001) για τη θεραπεία των νεφρών, για τα προβλήματα με το συκώτι, την παχυσαρκία και για τους πονοκεφάλους (Skoula & Sotiris, 1997).



Εικόνα 1.6. Δίκταμο (*Origanum dictamnus*)

Αριθμός μελετών περιγράφει τις βιολογικές δράσεις των εκχυλισμάτων του, όπως την αντιοξειδωτική (Proestos et al., 2013) (Tair et al., 2014), αντιμικροβιακή (Alexopoulos et al., 2011) και κυτταροτοξική δράση για διάφορες κυτταρικές σειρές (Chinou et al., 2007). Σε πρόσφατη μελέτη το 2015, παρατηρήθηκε ότι τα αιθέρια έλαια από Δίκταμο είχαν αντιμικροβιακή δράση και αντιοξειδωτική δράση, ενώ ανέστειλαν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές (Marrelli et al., 2015). Τα φαινολικά συστατικά και τα τερπενικά οξέα σε αφέψημα από Δίκταμο δίνονται στον Πίνακα 1.4 (Kogiannou et al., 2013).

Συστατικά	Αφέψημα από Δίκταμο (μg/200 ml)	
	Μέσος όρος	± τυπική απόκλιση
Φαινολικά οξέα		
α) υδροξυβενζοϊκά οξέα		
β - υδρόξυ βενζοϊκό οξύ	----	----
Βανιλλικό οξύ	11.2	1.6
Πρωτοκατεχικό οξύ	38.9	3.6
Συριγγικό οξύ	24.6	2.9
Γαλλικό οξύ	15.0	2.5
Π- υδροξυ- φαινυλοξικό οξύ	----	----
3,4-διυδρόξυ-φαινυλοξικό οξύ	73.4	17.3
β) υδροξυκινναμικά οξέα		
κινναμικό οξύ	5.8	0.5
ο- Κουμαρικό οξύ	10.1	0.8
π- Κουμαρικό οξύ	18.6	2.9
Φερουλικό οξύ	----	----
Καφεϊκό οξύ	67.8	6.8
Σιναπτικό οξύ	----	----
Χλωρογενικό οξύ	37.0	4.3
Ροσμαρινικό οξύ	7244	322.5
Φλαβονοειδή		
Χρυσίνη	28.9	0.8
Επικατεχίνη	36.2	1.9
Ναριγενίνη	22.0	1.0
Κατεχίνη	32.4	6.4
Γενιστεΐνη	31.4	1.8
Καμφερόλη	----	----
Κερκετίνη	15.7	2.9
Τερπενοειδή φαινολικά		
Θυμόλη	----	----

Καρβακρόλη	36416.9	2317.0
Τερπενικά οξέα		
Ολεανολικό οξύ	----	----
Ουρσολικό οξύ	----	----
Συνολικά		
Απλές πολυφαινόλες	44129.9	2697.5
Φαινολικά οξέα	7546.4	365.7
Φλαβονοειδή	166.6	7.3
Τερπενικά φαινολικά	36416.9	2317.0
Τερπενικά οξέα	----	----

Πίνακας 1.4. Φαινολικά συστατικά και τερπενικά οξέα αφεψήματος από Δίκταμο (Kogiannou et al., 2013).

1.3.3. Τσάι του βουνού (Sideritis syriaca)

Το γένος *Sideritis* ανήκει στην οικογένεια Labiateae το είδος Lamieae. (Güvença et al., 2005) (Aslana et al., 2006) (Log̃og̃lu et al., 2006). Το όνομα του γένους *Sideritis* L., προέρχεται από την ελληνική λέξη "sideros" (σίδηρος) και δόθηκε λόγω της χρήσης που είχαν αυτά τα φυτά από την αρχαιότητα για επούλωση πληγών που προκλήθηκαν από όπλα (Font Quer, 2000). Είναι κοινώς γνωστό και ως «Τσάι του Βουνού», λόγω του ότι ορισμένα είδη αναπτύσσονται σε ορεινές περιοχές και το αφέψημα που προέρχεται από αυτό το φυτό είναι γνωστό ως Τσάι του βοσκού (Lentini, 2000) (Güvença et al., 2005). Στη Βαλκανική Χερσόνησο, το τσάι του βουνού, είναι από τα πιο δημοφιλή αφεψήματα, εξαιτίας της ιδιαίτερης γεύσης του και τις πιθανές φαρμακολογικές ιδιότητες (Gonzalez-Burgos et al., 2011) (Gurib-Fakim, 2006) (Koleva et al., 2003). Συνήθως σερβίρεται με λεμόνι και μέλι και είναι γνωστό για το ευχάριστο άρωμα, την ιδιαίτερη γεύση και το κιτρινωπό χρώμα του (Gonzalez-Burgos et al., 2011).



Εικόνα 1.7. Τσάι του βουνού (*Sideritis syriaca*)

Στην παραδοσιακή ιατρική, τα παρασκευάσματα από Τσάι του βουνού χρησιμοποιούνται ως αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακά, αντιοξειδωτικά, αναλγητικά, αντιρρευματικά, και τονωτικά, ενώ το αφέψημα του εξακολουθεί να χρησιμοποιείται για ανακούφιση από το κοινό κρυολόγημα (**Gonzalez-Burgos et al., 2011**) (**Gurib-Fakim, 2006**) (**Koleva et al., 2003**). Οι φαρμακολογικές ιδιότητες που έχει το Τσάι του βουνού οφείλονται κυρίως στα флаβονοειδή και στα διτερπένια (**Armata et al., 2008**) (**Plioukas et al., 2010**) (**Tirrillini et al., 2001**). Τα φαινολικά συστατικά και τα τερπενικά οξέα που περιέχει το αφέψημα από Τσάι του βουνού δίνονται στον Πίνακα 1.5 (**Kogiannou et al., 2013**).

Συστατικά	Αφέψημα από Τσάι του βουνού (μg/200 ml)	
	Μέσος όρος	± τυπική απόκλιση
Φαινολικά οξέα		
α) υδροξυβενζοϊκά οξέα		
β - υδρόξυ βενζοϊκό οξύ	33.86	1.15
Βανιλλικό οξύ	24.85	0.35
Πρωτοκατεχικό οξύ	54.71	6.05
Συριγγικό οξύ	37.35	1.48
Γαλλικό οξύ	----	----
π- υδροξυ- φαινυλοξικό οξύ	----	----
3,4-διυδρόξυ-φαινυλοξικό οξύ	----	----
β) υδροξυκινναμικά οξέα		
κινναμικό οξύ	16.65	0.95
ο- Κουμαρικό οξύ	22.48	0.42
π- Κουμαρικό οξύ	56.72	6.56
Φερουλικό οξύ	28.83	0.53
Καφεϊκό οξύ	73.57	14.52
Σιναπτικό οξύ	----	----
Χλωρογενικό οξύ	828.49	87.21
Φλαβονοειδή		
Χρυσίνη	43.41	12.32

Επικατεχίνη	38.43	7.58
Ναριγενίνη	20.69	0.06
Κατεχίνη	30.55	1.75
Γενιστεΐνη	----	----
Καμφερόλη	----	----
Κερκετίνη	96.57	16.36
Τερπενοειδή φαινολικά		
Θυμόλη	-----	-----
Καρβακρόλη	1220	126.57
Τερπενικά οξέα		
Ολεανολικό οξύ	-----	----
Ουρσολικό οξύ	-----	----
Συνολικά		
Απλές πολυφαινόλες	2627.68	26.41
Φαινολικά οξέα	150.77	6.03
Υδροξυκιναμμωμικά οξέα	1026.75	107.45
Φλαβονοειδή	229.66	13.32
Τερπενικά φαινολικά	1220.50	126.57
Τερπενικά οξέα	-----	----

Πίνακας 1.5. Φαινολικά συστατικά και τερπενικά οξέα σε αφέψημα από Τσάι του βουνού (Kogiannou et al., 2013).

1.3.4. Φασκόμηλο (Salvia officinalis L)

Το Φασκόμηλο (οικογένεια Lamiaceae) είναι ένα αιωνόβιο ενδημικό φυτό της Μεσογείου, που έχει τη μορφή ξυλώδους θάμνου. Καλλιεργείται σε αρκετές χώρες, και τα αποξηραμένα φύλλα του χρησιμοποιούνται στην ιατρική, την αρωματοποιία και την βιομηχανία τροφίμων (Bruneton, 1999) (Zargari, 1997).

Μαζί με το Δεντρολίβανο (Rosmarinus officinalis L.), το φασκόμηλο έχει βρεθεί ότι



Εικόνα 1.8. Φασκόμηλο (Salvia Officinalis L.)

έχουν την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση μεταξύ των βοτάνων (**Madsen et al., 1997**) (**Cuppett & Hall, 1998**). Μερικές από τους φαινολικές ενώσεις του έδειξαν εξαιρετική δέσμευση των δραστικών ενώσεων οξυγόνου, όπως τα ανιόντα ριζών υπεροξειδίου, οι ρίζες υδροξυλίου και μονήρους οξυγόνου (singlet oxygen), αναστέλλοντας την υπεροξειδωση των λιπιδίων, (**Hohmann et al., 1999**) κατά συνέπεια, τα αντίστοιχα εκχυλίσματα έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη σταθεροποίηση του λιπαρών υλών και των τροφίμων που περιέχουν λίπος (**Ternes & Schwarz, 1995**). Οι πιο αποτελεσματικές αντιοξειδωτικές ενώσεις έχει δείχθει ότι είναι το ροσμαρινικό οξύ, το καρνοσικό οξύ και η καρνοσόλη, ακολουθούμενη από το καφεϊκό οξύ, τη ροσμανόλη, τη ροσμαδιάλη (**Cuvelier et al., 1996**).

Τα συστατικά του εκχυλίσματος των φύλλων *S. officinalis* είχαν διάφορες φαρμακολογικές επιδράσεις. Σε *in vitro* μελέτες παρατηρήθηκε αγωνιστική δραστηριότητα στο PPAR γ (**Rau et al., 2006**) (**Christensen et al., 2010**), αναστολή της παγκρεατικής λιπάσης, αναστολή απορρόφησης των λιπιδίων και αντιυπερτριγλυκεριδαιμικά αποτελέσματα σε ποντίκια (Ninomiya et al., 2004), αντίοξειδωτικές επιδράσεις και αναστολή της υπεροξειδωσης των λιπιδίων σε αρουραίους (**Oboh & Henle, 2009**). Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε ευαισθητοποίηση στην ινσουλίνη και ανασταλτικές επιδράσεις της γλυκονεογένεσης σε αρουραίους, στους οποίους χορηγήθηκε αφέψημα από Φασκόμηλο (**Lima et al., 2006**).

Σε μελέτη με γυναίκες ηλικίας 40-50 ετών, μετά από κατανάλωση αφεψήματος από φασκόμηλο (300ml νερό και 4 g αποξηραμένα φύλλα) για 4 βδομάδες, 2 φορές την ημέρα παρατηρήθηκαν χαμηλότερα επίπεδα LDL – C , ολική χοληστερόλη, LDL-C/HDL-C στο πλάσμα, ενώ αυξήθηκαν τα επίπεδα της HDL-C χωρίς να εμφανιστεί ηπατοτοξικότητα ή άλλες δυσμενείς επιδράσεις. Το *S. officinalis* περιέχει πτηνικά έλαια, ταννίνες, διτερπένια, τριτερπένια, στεροειδή, φλαβόνες και φλαβονοειδή (**Rau et al., 2006**) (**Christensen et al., 2010**) (**Ninomiya et al., 2004**). Σε μελέτη του Johnson προέκυψαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα σχετικά με την αντικαρκινική δράση του σε διάφορους τύπους καρκίνου (π.χ. προστάτη, στήθους, δέρματος, λευχαιμίας κ.α.) (**Johnson, 2001**). Στον Πίνακα 1.6. δίνονται τα φαινολικά συστατικά και τα τερπενικά οξέα σε αφέψημα φασκόμηλου (**Kaliora et al., 2014**).

Συστατικά	Αφέψημα από Φασκόμηλου (μg/200ml)	
	Μέσος όρος	± τυπική απόκλιση
Φαινολικά οξέα		
α) υδροξυβενζοϊκά οξέα		
Βανιλλικό οξύ	10.6	1.8
Πρωτοκατεχικό οξύ	22.0	2.9
Συριγγικό οξύ	13.0	1.8
Γαλλικό οξύ	----	----
π- υδροξυ- φαινυλοξικό οξύ	----	----
3,4-διυδρόξυ- φαινυλοξικό οξύ	7.0	0.9
β) υδροξυκινναμικά οξέα		
κινναμικό οξύ	3.0	0.3
ο- Κουμαρικό οξύ	10.2	1.9
π- Κουμαρικό οξύ	16.5	2.3
Φερουλικό οξύ	17.1	1.7
Καφεϊκό οξύ	262.8	70.5
Σιναπικό οξύ	12.9	0.3
Χλωρογενικό οξύ	16.4	2.3
Ροσμαρινικό οξύ	8082.7	99.8
Φλαβονοειδή		
Χρυσίνη	13.0	1.9
Επικατεχίνη	9.4	0.3
Ναριγενίνη	18.7	5.1
Κατεχίνη	15.9	1.0
Γενιστεΐνη	21.3	4.2

Καμφερόλη	11.5	1.4
Κερκετίνη	10.9	0.8
Τερπενοειδή φαινολικά		
Θυμόλη	1859.0	83.2
Καρβακρόλη	3745.3	290.4
Τερπενικά οξέα		
Ολεανολικό οξύ	66.2	5.7
Ουρσολικό οξύ	40.6	6.0
Συνολικά		
Απλές πολυφαινόλες	14181.9	475.2
Φαινολικά οξέα	8476.9	186.9
Φλαβονοειδή	100.7	12.5
Τερπενικά φαινολικά	5604.3	355.6
Τερπενικά οξέα	106.8	11.6

Πίνακας 1.6. Πολυφαινόλες και τερπενικά οξέα που περιέχει το αφέψημα από Φασκόμηλο (Kaliara et al., 2014).

1.3.5. Φλισκούνι (Mentha pulegium)

Το *Mentha pulegium*, γνωστό και ως Φλισκούνι, είναι ένα από τα ενδημικά είδη της Ευρώπης, της Αφρικής, της Μικράς Ασίας και της Ανατολής. Ανήκει στην οικογένεια Labiatae (Chalchat, 2000). Θεωρείται φαρμακευτικό φυτό λόγω των φαρμακολογικών και των βιολογικών ιδιοτήτων του. Το Φλισκούνι έχει χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά ως αντιβηχικό, και αντισηπτικό, καθώς και ως θεραπευτικό για το κρυολόγημα, ιγμορίτιδα, χολέρα, τροφική δηλητηρίαση, βρογχίτιδα και φυματίωση (Lemordant et al., 1977) (Newal, 1996). Το εκχύλισμα του *Mentha pulegium* χρησιμοποιείται στην παραδοσιακή ιατρική για την πέψη, της ηπατικές διαταραχές και της διαταραχής της χοληδόχου κύστης, την αμηνόρροια, την ουρική αρθρίτιδα, την αυξημένη ούρηση, τις παθήσεις του δέρματος και αποβολή εμβρύου (Gruenwald et al., 2000) (Agnihotri et al., 2005).

Το εκχύλισμά έχει αντιμυκητιακές και αντιβακτηριδιακές ιδιότητες (Sivropoulou et al., 1995) (Borneo et al., 2009) (Marzouk et al., 2008) (Boukhebti et al., 2011) (Ait-Ouazzou et al., 2012) (Teixeira et al., 2012) και είναι δραστικό έναντι μιας μεγάλης ποικιλίας μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων αρνητικών και θετικών κατά Gram βακτηρίων (Mahboubi & Haghi, 2008)



Εικόνα 1.9. Φλισκούνι (Mentha pulegium)

(Marzouk et al., 2008). Επίσης, εμφανίζει και αντιοξειδωτικές δράσεις, δεσμεύοντας ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (Oueslati et al., 2008) (Hajlaoui et al., 2009) (Kamkar et al., 2010) (Teixeira et al., 2012). Οι αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητές του καθώς και το άρωμα του το κάνουν ενδιαφέρον για τις βιομηχανίες τροφίμων. Χρησιμοποιείται στη μαγειρική, στην αρωματοθεραπεία και στα καλλυντικά (Gruenwald et al., 2000) (Agnihotri et al., 2005).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η σύσταση του αιθέριου ελαίου Metha pulegium παρουσιάζει διαφορές ανάλογα με τη γεωγραφική προέλευση (Lorenzo et al., 2002) (Stoyanova et al., 2005) (Boukhebti et al., 2011) Στον Πίνακα 1.7. φαίνονται τα φαινολικά συστατικά και τα τερπενικά οξέα σε αφέψημα από Φλισκούνι (Kogiannou et al., 2013)

Συστατικά	Αφέψημα από Φλισκούνι (μg/200 ml)	
	Μέσος όρος	± τυπική απόκλιση
Φαινολικά οξέα		
α) υδροξυβενζοϊκά οξέα		
β - υδρόξυ βενζοϊκό οξύ	17.69	7.73
Βανιλλικό οξύ	45.04	14.14
Πρωτοκατεχικό οξύ	23.33	4.48
Συριγγικό οξύ	35.26	9.05

Γαλλικό οξύ	----	----
π- υδροξυ- φαινυλοξικό οξύ	----	----
3,4-διυδρόξυ- φαινυλοξικό οξύ	18.28	0.90
β) υδροξυκινναμικά οξέα		
κινναμικό οξύ	14.37	4.93
ο- Κουμαρικό οξύ	29.34	8.37
π- Κουμαρικό οξύ	107.86	5.50
Φερουλικό οξύ	----	----
Καφεϊκό οξύ	375.42	185.25
Σιναπτικό οξύ	24.62	0.23
Χλωρογενικό οξύ	105.35	26.07
Φλαβονοειδή		
Χρυσίνη	46.58	1.00
Επικατεχίνη	22.90	3.18
Ναριγενίνη	----	----
Κατεχίνη	32.28	0.86
Γενιστεΐνη	----	----
Καμφερόλη	----	----
Κερκετίνη	----	----
Τερπενοειδή φαινολικά		
Θυμόλη	1727	56.27
Καρβακρόλη	3755	82.02
Τερπενικά οξέα		
Ολεανολικό οξύ	13.30	2.52
Ουρσολικό οξύ	21.99	2.81
Συνολικά		

Απλές πολυφαινόλες	6353.76	26.41
Φαινολικά οξέα	139.60	36.31
Υδροξυκιναμμωμικά οξέα	630.45	230.35
Φλαβονοειδή	101.71	3.03
Τερπενικά φαινολικά	5482.00	138.59
Τερπενικά οξέα	35.24	5.33

Πίνακας 1.7. Φαινολικά συστατικά και τερπενικά οξέα που περιέχονται σε αφέψημα από Φλισκούνη (Kogiannou et al., 2013)

1.4. Καρκίνος

Ο όρος «καρκίνος» είναι γενικός και περιλαμβάνει πολλές παθήσεις. Ο τεράστιος όγκος βασικών γνώσεων γύρω από τον κυτταρικό κύκλο, τη μοριακή γενετική, την αγγειογένεση και την κυτταρική προσκόλληση, που συγκεντρώθηκε από τα μέσα του 1970, έχει ως αποτέλεσμα την καλύτερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας του καρκίνου. Η κατανόηση αυτή αποτέλεσε κίνητρο διαδοχικών ερευνών, σχεδιασμένων με σκοπό την επανόρθωση των κυτταρικών και μοριακών φαινομένων που προκαλούν τον καρκίνο.

Η κακοήθης νεοπλασία είναι εμφανώς διαφορετική από τα φυσιολογικά κύτταρα του σώματος. Μερικοί από τους τρόπους με τους οποίους ο καρκίνος διαφοροποιείται από τα φυσιολογικά κύτταρα και όργανα αναφέρονται στον πιο κάτω πίνακα.

Απώλεια της διαφοροποίησης
Ανεξέλεγκτη αύξηση
Απώλεια της εξ' επαφής αναστολής <i>in vitro</i>
Διηθητική ικανότητα
Ελάττωση της απόπτωσης
Πρόκληση αγγειογένεσης

Πίνακας 1.8. Φαινότυπος του καρκίνου

Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να ζήσουν ανεξάρτητα, καλλιεργούμενα σε δοκιμαστικό σωλήνα ή σε τριβλίο (*in vitro*). Οι περισσότεροι καρκινικοί ιστοί δεν χρειάζονται αυξητικούς παράγοντες και τις ορμόνες που θα απαιτούσαν οι φυσιολογικοί ιστοί για να αυξηθούν έξω από το σώμα. Επιπλέον, τα καλλιεργούμενα καρκινικά κύτταρα τείνουν να αναπτύσσονται *in vitro* με ανοργάνωτο τρόπο και συχνά αναπτύσσονται το ένα επάνω από το άλλο, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα που παρουσιάζουν αναστολή εξ επαφής. Μερικά κακοήθη νεοπλασματικά κύτταρα δεν υφίστανται τον κανονικό προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο ή απόπτωση και συνεπώς, καθίστανται αθάνατα και ανθεκτικά στην χημειοθεραπεία και την ιονίζουσα ακτινοβολία. Τα κακοήθη νεοπλάσματα έχουν επίσης, την ικανότητα να δημιουργούν τη δική τους αιμάτωση – μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται αγγειογένεση.

Τα περισσότερα γεγονότα που οδηγούν στο φαινότυπο του καρκίνου, βρίσκονται κάτω από γενετικό έλεγχο. Συγκεκριμένες μεταλλάξεις ή μεγάλες απαλείψεις γονιδίων έχουν ως αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Μερικές τάξεις ή οικογένειες αυτών των μεταλλάξεων και απαλείψεων έχουν αναγνωριστεί. Τα πρώτα ογκογονίδια είναι γονίδια που έχουν διατηρηθεί κατά την εξελικτική διαδικασία και παίζουν σπουδαίο ρόλο στο φυσιολογικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Όταν τα πρωτοογκογονίδια μεταλλάσσονται, μπορούν να καταστούν ογκογονίδια που παράγουν πρωτεϊνικά προϊόντα ή ενώνονται με κάποιο γειτονικό γονίδιο, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται μεγάλες αλλαγές στην κυτταρική αύξηση. Ο καρκίνος σπάνια είναι το αποτέλεσμα μόνο μιας μετάλλαξης ή απώλειας ενός κατασταλτικού αλληλόμορφου γονιδίου. Ορισμένοι συμπαγείς όγκοι, όπως ο καρκίνος του παχέος εντέρου, προκύπτουν από διαδοχικά γεγονότα που συμβαίνουν σε διάστημα πολλών χρόνων. Οι επιδημιολογικές έρευνες έχουν αποκαλύψει την ύπαρξη σχέσεων μεταξύ συγκεκριμένων παραγόντων της διατροφής, του περιβάλλοντος και ορισμένων λοιμώξεων που συνδέονται με τη μεταγενέστερη ανάπτυξη καρκίνου. Το κάπνισμα, το βενζόλιο και οι ιονίζουσες ακτινοβολίες προκαλούν αρκετές βλάβες σε συγκεκριμένες γονιδιακές θέσεις (**Andreoli, 2003**).

Η καρκινογένεση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία, στην οποία συναντώνται πολλές φάσεις. Οι φάσεις αυτές μπορούν να είναι γενετικής προέλευσης, ή να οφείλονται σε μοριακές και κυτταρικές αλληλεπιδράσεις (**Young et al., 2005**) (**Das et al., 2007**). Οι τρεις φάσεις της καρκινογένεσης είναι:

- A) Έναρξη: το στάδιο αυτό είναι μη αναστρέψιμο. Η σειρά από γεγονότα περιλαμβάνει την έκθεση στον καρκινογόνο παράγοντα, που μεταφέρεται σε ιστούς και όργανα και στην συνέχεια μεταβολίζεται ή αποτοξινώνεται. Μπορεί να προκληθεί βλάβη στο DNA από τους δραστικούς μεταβολίτες (**Surh, 2008**).
- B) Προαγωγή: η φάση αυτή είναι αναστρέψιμη και διαρκεί περισσότερο από την φάση της έναρξης. Στην προαγωγή γίνεται απορρύθμιση των σηματοδοτικών μονοπατιών που υπό φυσιολογικές συνθήκες ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση (**Mehta et al., 2010**). Νεοπλασματικά

κύτταρα ονομάζονται τα κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη. Τα κύτταρα αυτά αντιγράφονται.

- Γ) Το τελευταίο στάδιο που περιγράφεται είναι η εξέλιξη του όγκου. Σε αυτή τη φάση συναντάμε απορρύθμιση των διαδικασιών του κυτταρικού κύκλου και της διαφοροποίησης. Επίσης, παρατηρείται μείωση της απόπτωσης στα κύτταρα με βλάβη (αύξηση κακοήθους όγκου) και αύξηση της μεταστατικής αγγειογενετικής ικανότητας (Surh, 2003) (Ramos, 2007).

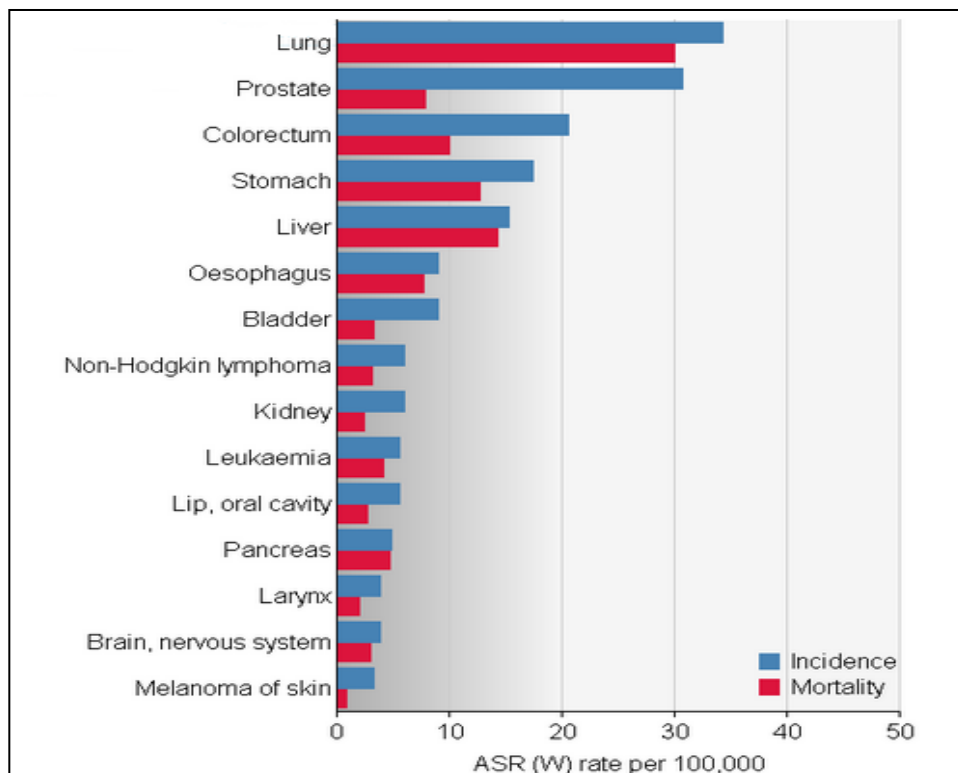
1.4.1. Καρκίνος του παχέος εντέρου

1.4.1.1. Επιδημιολογικά δεδομένα

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αύξηση των νέων περιστατικών καρκίνου. Ταυτόχρονα, αν και ο αριθμός του πληθυσμού αναμένεται να παραμείνει σχετικά σταθερός, το προσδόκιμο επιβίωσης αυξάνεται και κατά συνέπεια αναμένεται περαιτέρω αύξηση των νέων περιστατικών καρκίνου, δεδομένου ότι η νόσος αυτή παρουσιάζει θετική συσχέτιση με την ηλικία.

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι ο τρίτος πιο συνηθισμένος τύπος καρκίνου στους άνδρες (746.000 περιπτώσεις, 10,0% του συνόλου) και ο δεύτερος στις γυναίκες (614.000 περιπτώσεις, 9,2% του συνόλου) σε όλο τον κόσμο. Σχεδόν το 55% των περιπτώσεων συμβαίνουν σε περισσότερες αναπτυγμένες περιοχές. Υπάρχει ευρεία γεωγραφική διακύμανση στην επίπτωση σε όλο τον κόσμο και τα γεωγραφικά πρότυπα είναι πολύ παρόμοια σε άνδρες και γυναίκες: τα εκτιμώμενα υψηλότερα ποσοστά είναι στην Αυστραλία και τη Νέα Ζηλανδία (ASR 44,8 και 32,2 ανά 100.000 σε άνδρες και γυναίκες αντίστοιχα) ενώ το χαμηλότερο στη Δυτική Αφρική (4,5 και 3,8 ανά 100.000).

Τα υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας και για τα δύο φύλα παρατηρούνται στην Κεντρική και Ανατολική Ευρώπη (20,3 ανά 100.000 για τους άνδρες, 11,7 ανά 100.000 για τις γυναίκες) και τα χαμηλότερα στη Δυτική Αφρική (3,5 και 3,0, αντίστοιχα) (Globocan, 2012).



Εικόνα 1.10. Επιπολασμός και θνησιμότητα των διαφόρων τύπων καρκίνου σε παγκόσμια κλίμακα (Globocan, 2012).

1.4.1.2. Καρκίνος του παχέος εντέρου και παθοφυσιολογία

Η κληρονομικότητα παίζει σημαντικό ρόλο για την εμφάνιση καρκίνου και έχει ανακαλυφθεί ότι μερικά γονίδια, όπως τα DCC, MCC και APC, παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη αδενωμάτων και καρκίνων. Υπάρχει σαφής σχέση μεταξύ των αδενωματοδών πολυπόδων και της μεταγενέστερης ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου. Επειδή η αφαίρεση των πολυπόδων πιθανόν αποτελεί τον σπουδαιότερο τρόπο πρόληψης της ανάπτυξης διηθητικού καρκίνου του παχέος εντέρου, οι πιο αξιόπιστες μέθοδοι μείωσης των θανάτων από καρκίνο του παχέος και του ορθού είναι η περιοδική σιγμοειδοσκόπηση και η τακτική αναζήτηση αίματος στα κόπρανα. Για τους ασθενείς που έχουν ισχυρό οικογενειακό ιστορικό ή άλλες παθήσεις συνδεδεμένες με τον καρκίνο του παχέος εντέρου π.χ. ελκώδη κολίτιδα, πρέπει να εκτελείται εξέταση απεικόνισης ολόκληρου του παχέος εντέρου με έναρξη πριν από την ηλικία των 40 ετών.

Οι περισσότεροι ορθοκολικοί καρκίνοι πιστεύεται ότι αναπτύσσονται από ένα καλόηθες νεόπλασμα που ονομάζεται «αδένωμα» ή «αδενωματούδης» πολύποδας. Αδενώματα παρατηρούνται σε ποσοστό μέχρι και 40% των ατόμων ηλικίας άνω των 60 ετών, ενώ λίγα από αυτά εξελίσσονται σε ορθοκολικό καρκίνο. Το διάστημα που απαιτείται για να εξελιχθεί ένα αδένωμα σε διηθητικό καρκίνο είναι άγνωστο, αλλά στοιχεία πολλών παρατηρήσεων δείχνουν ότι είναι 10 χρόνια. Έχει διαφωτιστεί ένα μέρος της βιολογίας του ορθοκολικού καρκινώματος. Έτσι, στην ορθοκολική νεοπλασία έχουν διαγνωστεί επίκτητες μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο *kras* (χρωμόσωμα 12p). Στα κατασταλτικά των όγκων έχουν διαγνωστεί μεταλλάξεις στα γονίδια APC (στο χρωμόσωμα 5q) p53 (στο χρωμόσωμα 17p) και DCC (στο χρωμόσωμα 18q). Η συχνότητα και ο αριθμός των μεταλλάξεων αυξάνεται καθώς αυξάνεται το μέγεθος και η προκαρκινική δυσπλασία των αδενωμάτων. Εκτός από τις γενετικές μεταλλάξεις στα σωματικά και βλαστικά κύτταρα, πολλές επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι με την ορθοκολική καρκινογένεση σχετίζονται και διαιτητικοί παράγοντες. Στους πληθυσμούς που ακολουθούν δίαιτα φτωχή σε φυτικές ίνες, φρούτα και λαχανικά, αλλά πλούσια σε λίπος, ιδιαίτερα προερχόμενα από κόκκινα κρέατα, η συχνότητα της ορθοκολικής νεοπλασίας είναι μεγαλύτερη.

Ο κίνδυνος ανάπτυξης αδενωματοδών πολυπόδων και καρκίνου είναι μικρός στα άτομα κάτω των 40 ετών και αυξάνεται με την ηλικία, φθάνοντας στην μέγιστη τιμή του κατά την έβδομη και όγδοη δεκαετία της ζωής. Ο ορθοκολικός καρκίνος δεν φαίνεται να έχει προτιμήσεις φύλου ή φυλής αν και στους αφρικανούς πληθυσμούς παρατηρείται μεγαλύτερη συχνότητα η νόσος στο στάδιο IV (**Andreoli, 2003**).

1.4.2. Καρκίνος του προστάτη

1.4.2.1. Επιδημιολογικά δεδομένα

Ο καρκίνος του προστάτη είναι ο δεύτερος πιο κοινός καρκίνος στους άνδρες. Υπολογίζεται ότι 1,1 εκατομμύρια άνθρωποι σε όλο τον κόσμο είχαν διαγνωστεί με καρκίνο του προστάτη το 2012, αντιπροσωπεύοντας το 15% των καρκίνων σε άνδρες, με σχεδόν το 70% των περιπτώσεων (759000) να συμβαίνουν στις πιο ανεπτυγμένες περιοχές. Η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του προστάτη διαφέρει: τα ποσοστά είναι

υψηλότερα στην Αυστραλία / Νέα Ζηλανδία και τη Βόρεια Αμερική (ASR 111,6 και 97,2 ανά 100.000, αντίστοιχα), και στη Δυτική και Βόρεια Ευρώπη, γιατί η πρακτική ειδικού προστατικού αντιγόνου (PSA) και η επακόλουθη βιοψία έχει διαδοθεί ευρέως σε αυτές τις περιοχές. Τα ποσοστά εμφάνισης είναι επίσης σχετικά υψηλά σε ορισμένες λιγότερο αναπτυγμένες περιοχές όπως η Καραϊβική (79,8), Νότια Αφρική (61,8) και Νότια Αμερική (60,1), αλλά παραμένουν χαμηλά σε πληθυσμούς της Ασίας με τα εκτιμώμενα ποσοστά 10,5 και 4,5 στην Ανατολική και Νότιο-Κεντρική Ασία. Ο

Rank	Country	Age-Standardised Rate per 100,000 (World)
1	France, Martinique	227.2
2	Norway	129.7
3	France (metropolitan)	127.3
4	Trinidad and Tobago	123.9
5	Barbados	123.1
6	Sweden	119.0
7	Australia	115.2
8	New Caledonia	114.9
9	French Polynesia	114.6
10	Ireland	114.2
11	Switzerland	107.2
12	Iceland	106.6
13	France, Guadeloupe	105.2
14	United States of America	98.2
15	Finland	96.6
16	Estonia	94.4
17	Puerto Rico	93.2
18	New Zealand	92.2
19	Denmark	91.3
20	Belgium	90.9

καρκίνος του προστάτη **Εικόνα 1.11.** Ο επιπολασμός του καρκίνου του προστάτη σε διάφορες χώρες είναι η πέμπτη συχνότερη (World Cancer Research Fund, 2015)

αιτία θανάτου από καρκίνο στους άνδρες (6,6% του συνόλου των θανάτων των ανδρών) Το 2012 υπήρχαν κατ' εκτίμηση 307.000 θάνατοι. Τα ποσοστά θνησιμότητας είναι γενικά υψηλά σε περιοχές με κατεξοχήν έγχρωμο πληθυσμό (Καραϊβική, 29 ανά 100.000 και την Υποσαχάρια Αφρική, 19-24 ανά 100.000), πολύ χαμηλά στην Ασία (2,9 ανά 100.000 στη Κεντρική-Νότια Ασία) και μέτρια ποσοστά στην Αμερική και την Ωκεανία (**Globocan, 2012**).

1.4.2.2. Καρκίνος του προστάτη και παθοφυσιολογία

Ο καρκίνος του προστάτη αναπτύσσεται αργά και αυξάνει απότομα με την ηλικία, εξαρτάται από τα ανδρογόνα, και επηρεάζεται από την κληρονομικότητα.

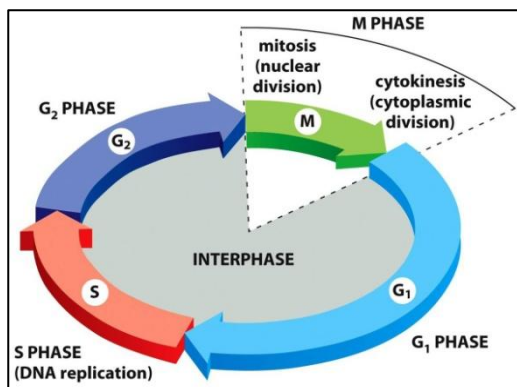
Οι άνδρες με ισχυρό οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του προστάτη μπορεί να έχουν πολλαπλάσιο κίνδυνο να αναπτύξουν τον συγκεκριμένο καρκίνο σε σχέση με άνδρες χωρίς τέτοιο ιστορικό (**Netter, 2009**).

Παρά τις έντονες προσπάθειες διευκρίνησης της παθογένειάς της, η αιτία και οι παράγοντες που προάγουν τη νόσο δεν έχουν ακόμη αποσαφηνιστεί. Πάντως, συσσωρεύονται συνεχώς ενδείξεις που υπαινίσσονται την εμπλοκή κληρονομούμενων αλλά κυρίως περιβαλλοντικών παραγόντων (Μελέκος & Μητσογιάννης, 2003).

1.5. Στάδια του κυτταρικού κύκλου:

Με τον όρο κυτταρικός κύκλος (cell cycle) αποδίδεται η διαδικασία με την οποία ένα κύτταρο οποιουδήποτε οργανισμού (μονοκύτταρου ή πολυκύτταρου) διέρχεται μέσω διαφόρων λειτουργικών φάσεων έως ότου τελικά να διαιρεθεί σε δυο θυγατρικά κύτταρα.

Ο κυτταρικός κύκλος διαιρείται σε δυο κύριες φάσεις οι οποίες είναι η μεσόφαση και η μίτωση (M) κατά την οποία τα διπλασιασμένα χρωμοσώματα διαμοιράζονται σε δύο πυρήνες. Η μεσόφαση είναι χρονικά πολύ πιο εκτεταμένη σε σχέση με τη μίτωση και διαιρείται σε τρεις επιμέρους φάσεις την G₀/G₁, την S, την G₂ (Μαργαρίτης, et al., 2008). Η φάση G₀ διαρκεί από ημέρες, μήνες, ή και χρόνια (Μαρμαράς & Λαμπροπούλου-Μαρμαρά, 2005).



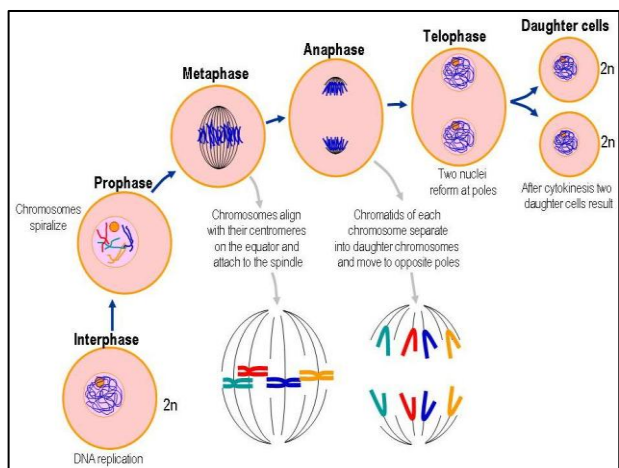
Εικόνα 1.12. Στάδια του κυτταρικού κύκλου

Τα πιο πολλά κύτταρα βγαίνουν από την φάση G₁ και μπαίνουν στην φάση G₀ προκειμένου να διαφοροποιηθούν. Η φάση G₁ είναι η φάση κατά την οποία το κύτταρο προετοιμάζεται για την αντιγραφή του DNA. Η διάρκεια της φάσης G₁ επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς ή φυσιολογικούς παράγοντες και διαρκεί περισσότερο από τις άλλες. Η σύνθεση όλων των απαραίτητων συστατικών για την δημιουργία των 2 θυγατρικών κυττάρων γίνεται στη φάση G₁, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του μεγέθους του κυττάρου σε αυτή την φάση.

Στην φάση S αρχίζει η σύνθεση του DNA. Στο τέλος αυτής της φάσης τα κύτταρα έχουν αντιγράψει όλο το γενετικό υλικό, με αποτέλεσμα στο κύτταρο να υπάρχουν δύο

διπλοειδείς σειρές γενετικής πληροφορίας. Επίσης, σε αυτό το στάδιο γίνεται σύνθεση ορισμένων πρωτεϊνών, όπως είναι οι ιστόνες. Παρόλα αυτά είναι γενικά μια ασύγχρονη διαδικασία δηλ. σε ένα κύτταρο τα διάφορα χρωμοσώματα καθώς και οι διαφορές μονάδες αντιγραφής του ίδιου χρωμοσώματος συνθέτουν το DNA τους σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα της φάσης S. Το κεντρομερίδιο (ετεροχρωματίνη) αντιγράφεται στο τέλος της φάσης S, ενώ το υπόλοιπο χρωμόσωμα σε όλη τη διάρκεια της φάσης. Η δομή της χρωματίνης στον χώρο συσχετίζεται με την αντιγραφή ότι DNA. Για κάθε κυτταρικό τύπο υπάρχει ειδική διαδικασία αντιγραφής η οποία φαίνεται να διατηρείται από γενιά σε γενιά. Ο έλεγχος του DNA γίνεται μόνο κατά την έναρξη. Οι ιστόνες και το DNA παράγονται στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, ενώ το σύνολο σχεδόν των υπόλοιπων πρωτεϊνών και του RNA παράγεται σε όλη την διαδικασία της μεσόφασης αλλά μειώνονται εξαιρετικά είτε σταματούν εντελώς κατά την μίτωση. Όσο αυξάνεται η κυτταρική μάζα από την φάση G1 προς την μίτωση, τόσο αυξάνεται και η μεταβολική δραστηριότητα και συνεπώς η σύνθεση των πρωτεϊνών του RNA

Η φάση G2 είναι η φάση από την αντιγραφή του DNA μέχρι την φάση M (μίτωση). Διάρκει 2 ώρες και στη φάση αυτή τα κύτταρα ελέγχουν και επιδιορθώνουν τη δομή του DNA και επιτελούν τις απαραίτητες προετοιμασίες για την μίτωση.



Εικόνα 1.13. Στάδια της Μίτωσης

Ως μίτωση (φάση M) ορίζεται η διαδικασία της πυρηνικής διαίρεσης κατά την οποία τα διπλασιασμένα χρωμοσώματα διαχωρίζονται το ένα από το άλλο και τοποθετούνται σε δυο

πυρήνες, καθένας από τους οποίους περιέχει ένα πλήρες αντίγραφο του γονιδιώματος. Η μίτωση συχνά ακολουθείται από την κυτταροκίνηση, διαδικασία κατά την οποία το κύτταρο διαιρείται στα δύο, μοιράζοντας το κυτταρόπλασμα σε δύο χονδρικά ίσα μέρη (Μαργαρίτης, et al., 2008).

Σε αυτή τη φάση παράγονται νέα κύτταρα τα οποία είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη, τη διατήρηση και την επιδιόρθωση ενός οργανισμού. Η πρόφαση, η προμετάφαση, η μετάφαση, η ανάφαση και η τελόφαση είναι οι πέντε φάσεις στις οποίες διακρίνεται η μίτωση **(Μαργαρίτης et al., 2008) (Μαρμαράς & Λαμπροπούλου-Μαρμαρά, 2005)**.

1.5.1.Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου

Το σύστημα ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου αποτελείται από μια σειρά πρωτεϊνικών συμπλόκων. Το κάθε σύμπλοκο αποτελείται από μια ρυθμιστική πρωτεΐνη, την κυκλίνη και από μια πρωτεϊνική κινάση. Οι κυκλίνες είναι πρωτεΐνες που λειτουργούν στις διάφορες φάσεις του κύκλου. Στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου συμμετέχουν κινάσες που φωσφορυλιώνουν πρωτεΐνες, και ενεργοποιούνται από τις κυκλίνες **(Μαργαρίτης, et al., 2008) (Μαρμαράς & Λαμπροπούλου-Μαρμαρά, 2005)**.

Η κυκλίνη D δρα στη φάση G1 ενώ οι κυκλίνες A και E δρουν στη φάση S. Οι κυκλίνες A και B δρουν στη μίτωση. Οι κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (Cdks, cyclin dependent kinases), είναι κινάσες που εκφράζονται σταθερά στον πυρήνα και ενεργοποιούνται όταν ενωθούν με την ρυθμιστική υπομονάδα της κυκλίνης. Κατά την μετάπτωση του κυτάρου από τη φάση G2 στην M συμμετέχει η Cdk1, ενώ η Cdk2 ρυθμίζει τη μετάπτωση από τη φάση G1 στη S. Η Cdk4 και η Cdk6 συμμετέχουν στην ρύθμιση της φάσης G1. Κάποια πρωτεΐνη η οποία είναι διαθέσιμη στη φάση M μπορεί να είναι διαθέσιμη και στην φάση G. Βασικός μηχανισμός ρύθμισης είναι η φωσφορυλίωση και η αποφωσφορυλίωση των Cdks, Άλλοι μηχανισμοί ρύθμισης είναι η πρωτεόλυση των κυκλινών και άλλων ρυθμιστικών μορίων του κύκλου, η δέσμευση πρωτεϊνών-αναστολέων των συμπλόκων καθώς και οι αλλαγές στη μεταγραφή των γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες-ρυθμιστές των Cdk.

Οι κύριοι ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου είναι οι κινάσες και οι φωσφατάσες που ρυθμίζουν τις Cdks, οι αναστολείς των Cdks, οι λιγάσες ουμπικιτίνης, οι πρωτεΐνες γονιδιακής ρύθμισης.

1.5.2. Τα στάδια του κυτταρικού κύκλου και καρκίνος.

Μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν ορισμένα πρωτεϊνικά σύμπλοκα έχουν ταυτιστεί με την εμφάνιση καρκίνου, δηλαδή είναι ογκογονίδια. Παραδείγματα τέτοιων περιπτώσεων είναι η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53, η οποία λειτουργεί ως αισθητήρας βλαβών του DNA και σταματά την πρόοδο του κύκλου στη φάση G1. Εάν και τα δύο αντίτυπα του γονιδίου μεταλλαχθούν, τότε ο κύκλος συνεχίζεται και το DNA προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης της ρυθμιστικής πρωτεΐνης επειδή έχει υποστεί βλάβη. Η ρυθμιστική πρωτεΐνη p53 αναστέλλει την ενεργότητα του συμπλόκου κυκλίνης – Cdk και αυτό έχει ως αποτέλεσμα το κύτταρο να παραμένει στην G1 φάση για να γίνει καλύτερη επιδιόρθωση του DNA. Το p53 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας και επάγει την p21, που είναι αναστολέας της ενεργότητας του συμπλόκου Cdk/κυκλίνης. Η p21 αναστέλλει άμεσα την αντιγραφή του DNA. Εάν υπάρχει μετάλλαξη του p53 και αυτή το καταστήσει ανενεργό ή παύει να συντίθεται από το κύτταρο, τότε το κύτταρο με το ελαττωματικό DNA δεν παραμένει στην φάση G1. Το κύτταρο αυτό είναι πιθανότερο να υποστεί απόπτωση ή να μεταπέσει σε καρκινικό. Σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση στον άνθρωπο φαίνεται να παίζει η μετάλλαξη στο p53. Επίσης, όταν υπάρχει βλάβη στο p53 το DNA, τότε φωσφορυλιώνει κινάσες, μια από τις οποίες είναι η AMT. Η μετάλλαξη της AMT έχει ως αποτέλεσμα αυξημένο κίνδυνο για καρκινογένεση, εμπλέκεται στην διαπίστωση βλαβών του DNA και διακόπτει μαζί με τα p53 τον κυτταρικό κύκλο, επίσης διατηρεί το φυσιολογικό μήκος των τελομερών.

1.6. Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος

Υπάρχουν δυο δρόμοι μέσω των οποίων το κύτταρο οδηγείται σε θάνατο. Ο πρώτος είναι μέσω του βίαιου θανάτου από τραυματισμό, μόλυνση, ή έκθεση σε χημικές ουσίες, ο οποίος ονομάζεται νέκρωση. Ο δεύτερος τρόπος είναι μέσω των οδών επαγωγής των μηχανισμών αυτοκαταστροφής, που είναι γνωστοί ως προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, ή απόπτωση. Ο πιο συχνά αναφερόμενος κυτταρικός δρόμος είναι η απόπτωση. Από τα υπάρχοντα δεδομένα φαίνεται ότι η απόπτωση προκαλείται για να επέλθει ισορροπία μεταξύ της απόσυρσης των θετικών μηνυμάτων, δηλ. μηνυμάτων απαραίτητων για την επιβίωση των κυττάρων και της

λήψης αρνητικών μηνυμάτων. Αν για κάποιο λόγο ένα κύτταρο αποστερηθεί τους παράγοντες επιβίωσης, τότε ενεργοποιείται η απόπτωση που οδηγεί το κύτταρο σε θάνατο. Παραδείγματα θετικών μηνυμάτων είναι οι αυξητικοί παράγοντες για τους νευρώνες και η ιντερλευκίνη-2. Τα αρνητικά μηνύματα προκαλούν την αύξηση των οξειδωτικών παραγόντων στο κύτταρο και βλάβες του DNA από οξειδωτικές ενώσεις, την υπεριώδη ακτινοβολία, τις ακτίνες X και διάφορα φάρμακα. Ο TNF- α , η λεμφοτοξίνη γνωστή και ως TNF- β καθώς και ο FasL (CD95) είναι ενεργοποιητές του κυτταρικού θανάτου.

Η απόπτωση είναι σημαντική γιατί διατηρεί σταθερό τον αριθμό των κυττάρων σε ιστούς στους οποίους τα κύτταρα αντικαθίστανται γρήγορα, όπως στην περίπτωση των κυττάρων του αίματος. Επίσης λειτουργεί ως αμυντικός μηχανισμός σε περιπτώσεις βλάβης του κυττάρου. Η απόπτωση παρεμποδίζει την εξάπλωση των ιών εξαλείφοντας τα μολυσμένα από ιούς κύτταρα και την εξάπλωση βλαβερών μεταλλάξεων όπως είναι οι βλάβες που οδηγούν σε καρκινογένεση εξαφανίζοντας ορισμένα κύτταρα (Μαργαρίτης et al., 2008) (Μαρμαράς & Λαμπροπούλου-Μαρμαρά, 2005).

1.6.1. Η επίδραση των φυτοχημικών στα στάδια του κυτταρικού κύκλου και στην απόπτωση

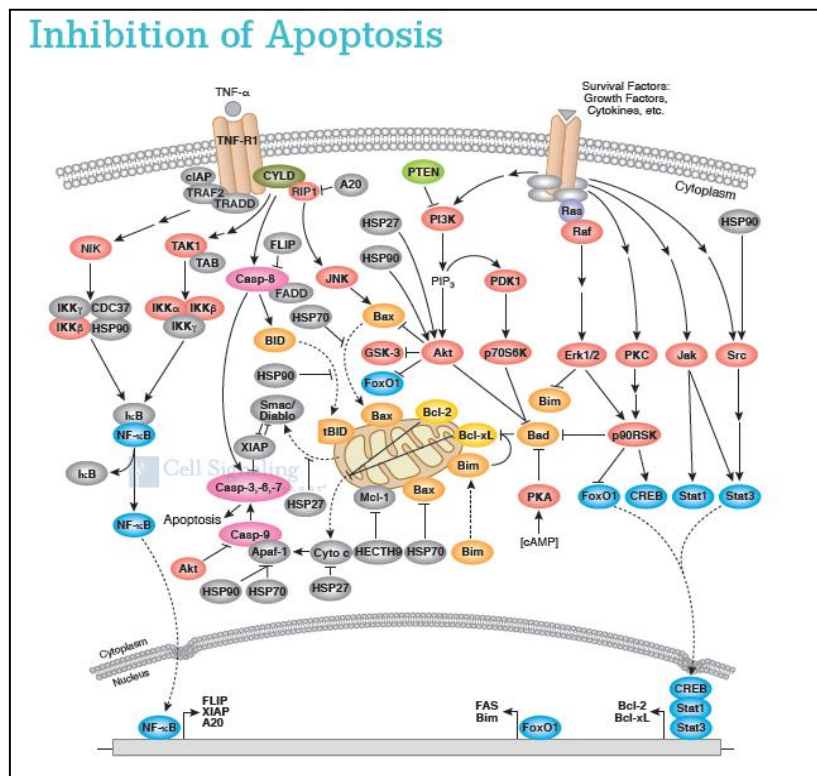
Σε ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, φαίνεται ότι τα φυτοχημικά επιδρούν στον κυτταρικό κύκλο και επάγουν την απόπτωση. Μελέτες που εξέτασαν το μηχανισμό δράσης των φυτοχημικών στο κυτταρικό κύκλο ανέφεραν ότι, ο γαλλικός εστέρας της επιλογαλλοκατεχίνης (EGCG) δεσμεύει την αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-xl (Leone et al., 2003) μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται τόσο σε καρκινικά όσο και σε φυσιολογικά κύτταρα (Cherbonnel-Lasserre & Dosanjh, 1997). Μία πρόσφατη μελέτη κατέληξε στο συμπέρασμα ότι ο EGCG ευθύνεται για την καταστροφή των μιτοχονδρίων σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου (HT29) (Chen et al., 2003).

Η καμφερόλη επάγει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων των ωοθηκών μέσω της ενεργοποίησης της p53 (Luo et al., 2011). Η p53 λαμβάνει μέρος στον έλεγχο της μετάβασης του κυττάρου από την φάση G1 στην φάση S και στον έλεγχο της μετάβασης από την φάση G2 στην μίτωση (M) (Cell Signal Technology Group, 2016).

Οι Canene-Adams και συνεργάτες εξέτασαν την χημειοπροστατευτική δράση του λυκοπενίου σε αρουραίους με καρκίνο στον προστάτη. Σε αυτή την μελέτη παρατήρησαν ότι οι όγκοι των αρουραίων που κατανάλωναν σκόνη από αποξηραμένη ντομάτα μεγάλωναν με πιο αργό ρυθμό σε σχέση με τους όγκους των αρουραίων που κατανάλωναν μόνο λυκοπένιο. Έτσι, κατάληξαν στο συμπέρασμα ότι το λυκοπένιο, το οποίο είναι το πιο σημαντικό συστατικό της ντομάτας, δεν έχει την ικανότητα μόνο του να αναστείλει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του προστάτη (Canene-Adams, et al., 2007).

Ένας από τους μηχανισμούς μέσω των οποίων η ρεσβερατρόλη αναστέλλει την μετάσταση του καρκίνου, είναι αυτός της μείωσης των επιπέδων του p38 (Sanchez-Fidalgo et al., 2010). Το p38 συμβάλλει στην βιοσύνθεση TNF-α, προκαλεί παραγωγή

κυτταροκινών και συμβάλλει στην απόπτωση (Cell Signal Technology Group, 2015).



Εικόνα 1.14. Αναστολή της απόπτωσης (Cell Signal Technology Group, 2015)

αναστείλει την μετάσταση των καρκινικών κυττάρων από τον μαστό στα οστά (Xu et al., 2010).

Οι Xu και συνεργάτες, μελέτησαν την επίδραση του ροσμαρινικού οξέος σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου (LS 174-T) και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το ροσμαρινικό οξύ ανέστειλε την μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (Xu et al., 2010). Επιπλέον, σε μια

άλλη μελέτη έδειξε ότι το ροσμαρινικό οξύ μπορεί να

Ένα άλλο φυτοχημικό συστατικό, η κουρκουμίνη ρυθμίζει την ανάπτυξη των κυτταρικών όγκων μέσω της ρύθμισης των πολλαπλών κυτταρικών μονοπατιών σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένου του μονοπατιού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (κυκλίνη D1, c-myc), του μονοπατιού κυτταρικής επιβίωσης (Bcl-2, Bcl-x, c FLIP, XIAP, c- IAP1), του μονοπατιού δράσης της κασπάσης (κασπάση -8, 3, 9), των ογκοκατασταλτικών μονο-πατιών (p53, p21), του μονοπατιού του υποδοχέα θανάτου (DR4, DR5) και των μονοπατιών πρωτεϊνικής κινάσης (JNK, Akt, AMPK) **(Ravindran et al., 2009)**. Μια άλλη μελέτη επιβεβαιώνει ότι η κουρκουμίνη ενεργοποιεί την κασπάση-3 **(Jeong et al., 2004)**. Επιπλέον, παρατηρήθηκε χρονοεξάρτηση και δόσοεξάρτηση της κουρκουμίνης με την φωσφορυλίωση της Akt και του mTOR σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του προστάτη **(Kim et al., 2006)**. Η Akt αναστέλλει την απόπτωση των κυττάρων μέσω αναστολής της κασπάσης – 9 **(Cell Signal Technology Group, 2015)**.

1.7. Ελεύθερες ρίζες – Αντιοξειδωτικά

Οι ελεύθερες ρίζες και οι δραστικοί μεταβολίτες που παράγονται στο κύτταρο ονομάζονται ROS (Δραστικές ενώσεις οξυγόνου) (Halliwell & Gutteridge, 1998). Οι δραστικές ενώσεις οξυγόνου είναι ρίζες, ιόντα ή μόρια που έχουν ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στοιβάδα (Geou-Yarh & Peter, 2010). Με τον όρο αντιοξειδωτικό νοείται «όποιο συστατικό καθυστερεί, προλαμβάνει ή μειώνει την οξειδωτική καταστροφή στα μόρια-στόχους» (Halliwell & Gutteridge, 1998). Ο φυσιολογικός ρόλος αυτών των συστατικών, είναι η προληπτική καταστροφή των κυτταρικών συστατικών που προκύπτουν από χημικές αντιδράσεις στις οποίες εμπλέκονται οι ελεύθερες ρίζες (Young & Woodside, 2001).

1.7.1. Παραγωγή ελευθέρων ριζών

Η αερόβια ζωή εξαρτάται από τα μόρια οξυγόνου, τα οποία χρησιμοποιούνται σε όλα τα αερόβια κύτταρα από εξειδικευμένα οργανίδια, τα μιτοχόνδρια για τη βασική διεργασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Λόγω της λειτουργίας σε ένα περιβάλλον πλούσιο σε οξυγόνο, τα πρωτεϊνικά συστατικά της μιτοχονδριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, οι μεταβολίτες του κύκλου του κιτρικού οξέος, ταυτόχρονα με άλλα ένζυμα θεωρούνται ως κύριες μιτοχονδριακές πηγές των ελευθέρων ριζών (Cos et al., 1998) (van Acker et al., 1995) (Lotito & Frei, 2006) (Yeh et al., 2005).

Σε άλλα σημεία του κυττάρου, η κυτταρική παραγωγή των ROS περιλαμβάνει μικροσωμάτια, υπεροξυσωμάτια ή κυτόχρωμα P450. Επιπλέον, ορισμένα κυτταροσολικά ένζυμα (cytosolic), όπως για παράδειγμα η υπεροξειδική δισμουτάση του χαλκού και του ψευδαργύρου, η οξειδάση της ξανθίνης, η αναγωγή του κυτοχρώματος P450 ή οι οξειδάσες του NADPH έχουν αναγνωριστεί ως ισχυροί παραγωγοί ελευθέρων ριζών (Winterbourn et al., 2000) (Bedard & Krause, 2007). Επίσης, ένας αριθμός εξωγενών φυσικών και χημικών παραγόντων όπως υπεριώδης ακτινοβολία, ακτίνες Χ, ή χημικές ενώσεις (π.χ. ξενοβιοτικά) είναι γνωστό ότι είναι υπεύθυνοι για την διέγερση του κυτταρικού σχηματισμού δραστικών ενώσεων οξυγόνου (ROS) ή δραστικών ενώσεων αζώτου (RNS) (Sheu et al., 2006). Η μιτοχονδριακή παραγωγή ROS θεωρείται ένα συστατικό από τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος κατά την διάρκεια της απόπτωσης (Hughes et al., 2005). Τα ROS μπορούν επίσης να

παρεμβαίνουν στην έκφραση γονιδίων (**Palmer & Paulson, 1997**) ή να επηρεάσουν την πρωτεϊνική φωσφορυλίωση (**Storz, 2005**). Σε ορισμένες περιπτώσεις οι ROS θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως «προστατευτικά» μόρια που έχουν θετικό αντίκτυπο στην φλεγμονή (**Halliwell, 2006**) (**Hultqvist et al., 2009**). Τα ROS έχουν την ικανότητα να προκαλούν μη αναστρέψιμη οξειδωση των θεμελιωδών βιολογικών μακρομορίων, όπως είναι οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια, τα νουκλεοτίδια και οι υδατάνθρακες (**Stadtman & Levine, 2000**) (**Richter et al., 1988**).

Η ποσότητα των ROS στο κύτταρο βρίσκεται σε αυστηρό έλεγχο. Κάθε κύτταρο έχει ένα ισχυρό αμυντικό σύστημα, μια ποικιλία από διαφορετικά αντιοξειδωτικά μόρια που λειτουργούν σε υδρόφιλο ή λιπόφιλο περιβάλλον, ικανά να εξαλείψουν πιθανά επικίνδυνα είδη. Η πιο προφανής ομάδα αντιοξειδωτικών είναι τα ένζυμα, όπως τα ένζυμα της οικογένειας SOD τα οποία καταλύουν τη μετατροπή της υπεροξειδικής ρίζας O_2^- σε H_2O_2 . Το H_2O_2 , ανάλογα από τον τύπο της προέλευσης του, θα μπορεί να αποσυντεθεί είτε από μια από τις υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (**Nomura et al., 2000**), είτε από τις καταλάσες που βρίσκονται σε αφθονία στα υπεροξυσώματα ή στα μιτοχόνδρια της καρδιάς (**Radi et al., 1991**). Άλλη ομάδα αντιοξειδωτικών είναι οι βιταμίνες, όπως οι βιταμίνες C, E, A που θεωρούνται αντιοξειδωτικές, προστατεύοντας ενάντια στις RNS. Επίσης τα διατροφικά προσλαμβανόμενα φυτοχημικά όπως τα φλαβονοειδή και τα καροτενοειδή θεωρούνται ισχυρά αντιοξειδωτικά. Το σελήνιο, το συνένζυμο Q10, το ουρικό οξύ είναι σημαντικά αντιοξειδωτικά (**Tinggi, 2008**) (**Burk, 2002**) (**Sautin & Johnson, 2008**) (**Grune et al., 2005**).

Οι πολυφαινόλες δρουν ως αντιοξειδωτικά δεσμεύοντας ελεύθερες ρίζες. Αυτό γίνεται με δύο τρόπους. Ο πρώτος είναι μέσω μιας άμεσης διαδικασίας μεταφοράς υδρογόνου και ο άλλος μέσω μια συζευγμένης μεταφοράς πρωτονίου και ηλεκτρονίου.

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

Όπου,

PPH = πολυφαινόλες

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

PP• = φαινοξυ-ρίζα, ελεύθερη ρίζα πολυφαινόλης

Η φαινοξυ-ρίζα PP•, είναι σχετικά σταθερό μόριο λόγω του απεντοπισμού των μη συζευγμένων ηλεκτρονίων στο φαινολικό δακτύλιο μέσω συντονισμού που σταθεροποιεί την ρίζα, καθιστώντας δύσκολη τη συνέχιση της αλυσιδωτής αντίδρασης μετά την προσβολή από το O₂ (**Shahidi & Wanasundara, 1992**). Επιπλέον οι PP• μπορούν να δράσουν ως τερματιστές της αλυσιδωτής αντίδρασης των ριζών, αντιδρώντας με άλλες ρίζες, δηλαδή $R^{\bullet} + PP^{\bullet} \rightarrow ROPP$.

Οι βασικές ιδιότητες που κάνουν τις πολυφαινόλες αντιοξειδωτικές ουσίες είναι ότι εμποδίζουν ή καθυστερούν την οξείδωση του υποστρώματος παρουσία ελευθέρων ριζών και παραμένουν αδρανείς ακόμα και μετά τη μετατροπή τους σε ρίζες, παρόλο που βρίσκονται σε μικρότερες συγκεντρώσεις συγκριτικά με το οξειδωμένο υπόστρωμα (**Rice-Evans et al., 1996**) (**Robards et al., 1999**).

Η απώλεια της ισορροπίας μεταξύ των ROS και των αντιοξειδωτικών έχει ως συνέπεια τη συσσώρευση των ROS, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε μια σειρά από ανωμαλίες που σχετίζονται με χρόνιες ασθένειες. Οι πιο συνηθισμένες είναι ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, οι νευρολογικές διαταραχές, διάφοροι τύποι φλεγμονής, καθώς και διεργασίες που σχετίζονται με την γήρανση (**Pacher et al., 2007**) (**Brookes et al., 2004**) (**Wen et al., 2013**).

1.7.2. Δραστικές ενώσεις οξυγόνου και καρκίνος

Σε καρκινικά κύτταρα, τα αυξημένα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS μπορούν να είναι αποτέλεσμα της αυξημένης μεταβολικής δραστηριότητας, της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας, της δραστηριότητας των υπεροξυσωμάτων, των αυξημένων κυτταρικών υποδοχέων σηματοδότησης, της ογκογονιδιακής δραστηριότητας, της αυξημένης δράσης των οξειδασών, των κυκλοξυγονασών, και των λιποξυγονασών (**Storz, 2005**) (**Szatrowski & Nathan, 1991**) (**Babio, 1999**).

Οι αυξημένοι παράγοντες και οι κυτταροκίνες διεγείρουν την παραγωγή των ROS και ασκούν ποικίλες βιολογικές δράσεις στον καρκίνο (**Bae et al., 2000**) (**Burdon, 1995**) (**Goustin et al., 1986**) (**Sundaresan et al., 1995**). Για παράδειγμα, μια αύξηση του

υπεροξειδίου του υδρογόνου και των επιπέδων νιτρώδους οξειδίου ανιχνεύθηκε σε κυτταρικούς όγκους όταν έδωσαν IFN- γ και TNF- α (Tiku et al., 1990) (Lo & Cruz, 1995). Περαιτέρω, ο PDGF (προερχόμενος από αιμοπετάλια αυξητικός παράγοντας), ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), η ινσουλίνη, ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού (TGF β), η ιντερλευκίνη – 1 (IL-1), ο παράγοντας νέκρωσης όγκων- α (TNF- α), η αγγειοτενσίνη, και το λυσοφωσφατιδικό οξύ διεγείρουν το σχηματισμό υπεροξειδίου (Bae et al., 2000) (Meier et al., 1989) (Roy et al., 2006) (Ohba et al., 1994) (Chen et al., 1995) (Griendling et al., 1994). Πολλοί καρκίνοι προκύπτουν από περιοχές με χρόνιους ερεθισμούς, μολύνσεις ή φλεγμονές (Balkwill, 2009) (Berasain, et al., 2009) (Xiao & Yang, 2008).

Τα μακροφάγα διεγείρουν την παραγωγή των ROS εντός των κυτταρικών όγκων μέσω της έκκρισης διαφόρων ερεθισμάτων όπως TNF- α . Η παραγωγή των ROS από ουδετερόφιλα και μακροφάγα ως μηχανισμός για να σκοτώσουν τα καρκινικά κύτταρα είναι καλά εδραιωμένος. (Babior BM., 1995) (Segal & Shatwell, 1997) Οι δραστικές ενώσεις οξυγόνου και ιδιαίτερα το υπεροξειδίο του υδρογόνου επιδρούν σε μονοπάτια σηματοδότησης (Sundaresan et al., 1995) (Chiarugi & Fiaschi, 2007) (Rhee et al., 2000).

Τα ROS μπορούν να ρυθμίσουν την αύξηση των επιπέδων των mRNA των κυκλινών, που επιτρέπουν την μετάβαση των κυττάρων από την φάση G1 στην φάση S. Οι κυκλίνες που ρυθμίζουν είναι κυκλίνες B2, D3, E1, E2 (Felty et al., 2005). Η δυσανάλογη αύξηση των ενδοκυττάρων ROS μπορεί να προκαλέσει διακοπή κύκλου των καρκινικών κυττάρων, γήρανση και απόπτωση. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την χημειοθεραπεία του καρκίνου, την εξάντληση των κυττάρων από αντιοξειδωτικές πρωτεΐνες ή την παραγωγή του ROS από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (Cadenas, 2004) (Simon et al., 2000).

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν να εξετάσει η ικανότητα των αφεψημάτων από Αντωναΐδα, Δίκταμο, Τσάι του βουνού, Φασκόμηλο, Φλισκούνη α) να προκαλούν *in vitro* αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού παρεμβαίνοντας σε στάδια του κυτταρικού κύκλου β) να επάγουν την απόπτωση και γ) να επηρεάζουν τα επίπεδα οξειδωτικού στρες, σε καρκινικές σειρές του παχέος εντέρου (HT29) και του προστάτη (PC3).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1.Αφεψήματα βοτάνων

2.1.1. Παρασκευή και αφυδάτωση Αφεψημάτων Βοτάνων

Μελετήθηκαν 5 βότανα της Ελληνικής χλωρίδας. Όλα τα βότανα παραλήφθηκαν τυποποιημένα από τη Νύβριτο Ηρακλείου Κρήτης, σε συσκευασίες των 250g.

Τα βότανα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: Αντωναΐδα ή Τεύκριο (*Origanum Microphyllum*), Δίκταμο (*Origanum dictamnus*), Τσάι του βουνού (*Sideritis Syriaca*), Φασκόμηλο (*Salvia officinalis*), Φλισκούνη (*Mentha pulegium*). Όλα τα βότανα ανήκουν στην οικογένεια *Lamiaceae*.

Υλικά- Όργανα

Συσκευή λυοφιλίωσης

Θερμαντική πλάκα

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων

Βαθουκαταψύκτης -40° C

Γυάλινη κανάτα βρασμού

Γυάλινο χωνί

Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες με βιδωτό πώμα

Διηθητικό χαρτί

Μεταλλικό νερό

Ογκομετρικός κύλινδρος 250mL

Ποτήρια ζέσεως 100mL

Αναλυτική πορεία:

Ποσότητα 3 g βοτάνου ζυγίζεται σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων. Με ογκομετρικό κύλινδρο λαμβάνονται 250 mL μεταλλικού νερού και τοποθετούνται σε γυάλινο σκεύος βρασμού από βοριοπυριτικό γυαλί (pyrex) μαζί με την προαναφερόμενη ποσότητα βοτάνου (δείγματος). Σε προθερμασμένη θερμαντική πλάκα τοποθετείται το γυάλινο σκεύος και απομακρύνεται από αυτήν 3 λεπτά μετά την έναρξη του βρασμού. Αφήνεται το αφέψημα 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μετά

διηθείται. Εκτιμάται ότι η απώλεια νερού κατά τον βρασμό ανέρχεται περίπου στα 50 mL. Σε περίπτωση που ο όγκος είναι μικρότερος από 200 mL τότε γίνεται συμπλήρωση με μεταλλικό νερό. Έπειτα, το αφέψημα τοποθετείται σε πλαστικά δοχεία όγκου 100 mL τα οποία καλύπτονται με parafilm και ψύχονται για 24 ώρες στους -40°C . Η αφυδάτωση των αφεψημάτων γίνεται με λυοφιλίωση επί 72 ώρες.

Προκειμένου τα αποτελέσματα να διορθωθούν ως προς τα διαλυμένα άλατα νερού, γίνεται επίσης λυοφιλίωση ίσου όγκου νερού, σε πλαστικά δοχεία αντίστοιχα με εκείνα που τοποθετήθηκαν τα αφεψήματα. Το στερεό υπόλειμμα κάθε αφεψήματος ζυγίζεται, τοποθετείται σε γυάλινο φιαλίδιο με βιδωτό πώμα και έπειτα τοποθετείται για ψύξη στους -40°C . Η διαδικασία παρασκευής και αφυδάτωσης των αφεψημάτων είναι η ίδια για όλα τα βότανα.

2.1.2. Έλεγχος βιοδραστικότητας των αφεψημάτων

Αντιδραστήρια- Όργανα

Καταψύκτης -20°C

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων

Αποστειρωμένα φιαλίδια erpendorf χωρητικότητας 1,5mL

Αποστειρωμένα φίλτρα με πόρους διαμέτρου 0.20μm

Αποστειρωμένες σύριγγες 5mL

Αυτόματες πιπέτες 100-1000μL και tips

Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής

Καλλιεργητικό υλικό RPMI -1640, με 20μM HEPES και L-γλουταμίνη, χωρίς NaHCO_3

Πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες των 5mL

Αναλυτική πορεία

Τα δείγματα αποψύχονται σε σκοτεινό μέρος, ενώ το καλλιεργητικό υλικό βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου. Ζυγίζονται 150- 220 mg από κάθε δείγμα σε αναλυτικό ζυγό. Ανάλογα με τη ζυγισθείσα ποσότητα αφυδατωμένου αφεψήματος προστίθεται κατάλληλος όγκος καλλιεργητικού υλικού, ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 200 μg/ mL. Για καλύτερη διαλυτοποίηση, μεταφέρεται ο δοκιμαστικός σωλήνας στην συσκευή Elmasonic S60, όπου γίνεται ανάδευση για 5 λεπτά. Λαμβάνεται το

περιεχόμενο του δοκιμαστικού σωλήνα με αποστειρωμένη σύριγγα των 5 mL. Το διάλυμα αποστειρώνεται μέσω αποστειρωμένου πλαστικού φίλτρου με διάμετρο πόρων 0,20 μm. Το αποστειρωμένο διάλυμα συλλέγεται σε φιαλίδια errendorf του 1,5 mL και αποθηκεύεται στους -20°C.

2.2. Κυτταρικές σειρές:

HT29:

Τα HT29 είναι επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου από Καυκάσια γυναίκα ηλικίας 44 ετών, που απομονώθηκαν από πρωτογενή όγκο.

PC3:

Τα PC3 είναι επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα από 4^{ου} βαθμού αδενοκαρκίνωμα από Καυκάσιο άντρα ηλικίας 62 ετών, που δημιουργήθηκαν μετά από μετάσταση στα οστά.

2.2.1. Καλλιέργεια κυττάρων.

Η διαδικασία (αντιδραστήρια, όργανα, πορεία) που ακολουθήθηκε ήταν η ίδια και για τις δυο κυτταρικές σειρές.

Αντιδραστήρια-Όργανα

Αποστειρωμένα κρυογονικά φιαλίδια των 2mL

Tips αποστειρωμένα

Αποστειρωμένα πλαστικά σιφώνια των 5 ή 10mL

Αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα PBS 20mM, pH 7.4

Αυτόματες πιπέττες (200-1000μL)

Βόειος ορός (FBS)

Διάλυμα θρυψίνης-EDTA

Χρωστική κυανού του τρυπανίου (trypan blue)

Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)

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

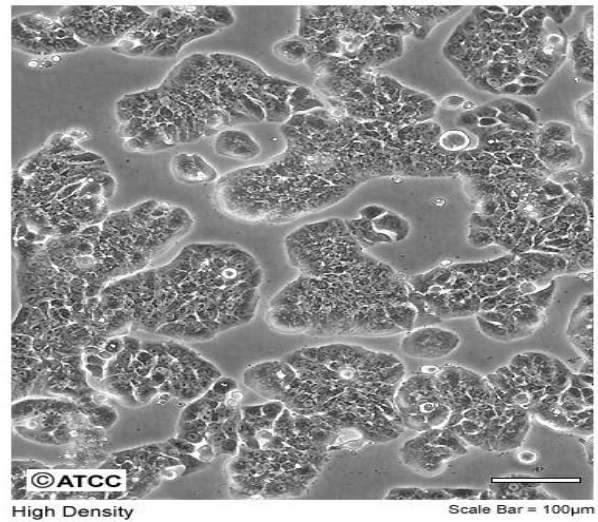
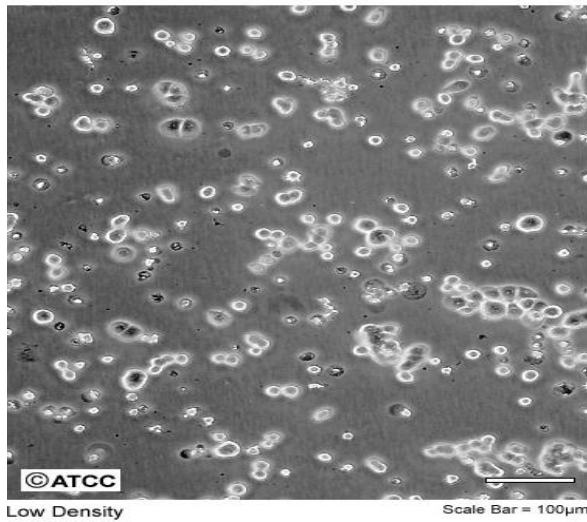
Επωαστικός θάλαμος (συνθήκες: 37°C, 5% CO₂)
Ερευνητικό μικροσκόπιο φθορισμού με κάμερα και οθόνη
Καλλιεργητικό υλικό DMEM
Καταψύκτης (-20°C)
Πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη
Υγρό άζωτο (-196°C)
Υπερκατάψυξη (-80°C)
Καλλιεργητικές φλάσκες
Ψυγεία,
Θάλαμος διπλής κάθετης νηματικής ροής (LAMINAR FLOW) με λυχνίες UV

Αναλυτική πορεία

Το θρεπτικό υλικό για την ανάπτυξη των κυττάρων περιέχει DMEM, 10 % FBS, 100 U/MI πενικιλίνης, 10 µg/ mL στρεπτομυκίνης και διατηρείται στους 37°C και 5% CO₂.

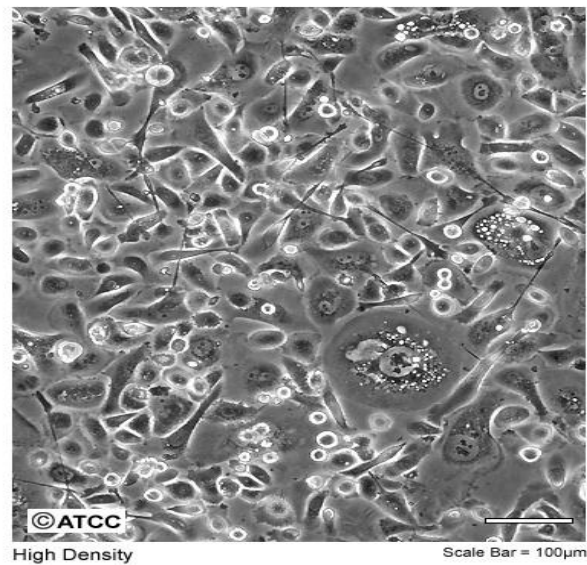
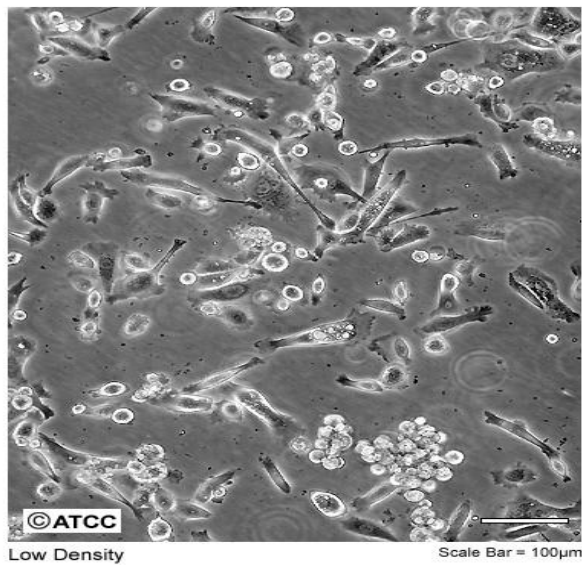
Ο χρόνος που απαιτείται για την ανάπτυξη συνοχής- συρροής των κυττάρων κατά τον οποίο σχηματίζεται συνεχόμενο μονόστιβο επιθήλιο που καλύπτει το 80% του πυθμένα της φλάσκας καθορίζεται με την βοήθεια μικροσκοπίου. Ο χρόνος διπλασιασμού υπολογίζεται στις 48 ώρες. Το θρεπτικό υλικό απομακρύνεται από την φλάσκα, ώστε να γίνει μέτρηση, γίνεται πλύση με PBS (5 mL) και κατόπιν γίνεται προσθήκη 3 mL διαλύματος θρυψίνης – EDTA. Ακολουθεί παρακολούθηση στο μικροσκόπιο μέχρι να αποκολληθεί η στιβάδα από την φλάσκα (5-15 λεπτά). Σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει θρεπτικό υλικό (15-20 mL) τοποθετούνται τα κύτταρα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στο 1800 rpm στους 20 °C, ώστε να απομακρυνθεί η θρυψίνη- EDTA. Τα κύτταρα πλένονται για ακόμα μια φορά και ακολουθεί διαχωρισμός (split) των κυττάρων στην φλάσκα προς 1/3 - 1/8 για τα HT29 και προς 1/3 - 1/6 για τα PC3.

ATCC Number: **HTB-38**
Designation: **HT-29**



Εικόνα 2.1: Καλλιέργεια επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου HT29. Αριστερά: χαμηλή πυκνότητα. Δεξιά: υψηλή πυκνότητα. Κλίμακα 100µm. (Lgcstandards, 2015)

ATCC Number: **CRL-1435**
Designation: **PC-3**



Εικόνα 2.2 Καλλιέργεια επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων προστάτη PC3. Αριστερά: χαμηλή πυκνότητα. Δεξιά: υψηλή πυκνότητα. Κλίμακα 100µm. (Lgcstandards, 2015)

2.2.2. Ψύξη και απόψυξη κυττάρων

Για την κατάψυξη των κυττάρων η καλλιέργεια, αφού εκπλυθεί 2 φορές, φυγοκεντρείται σε 1800 rpm για 5 λεπτά στους 20 °C, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε διάλυμα ψύξης. Το διάλυμα ψύξης αποτελείται από 20 % FBS και 10 % DMSO. Η πυκνότητα των κυττάρων ρυθμίζεται στα 5×10^6 κύτταρα / mL. Σε κρυογονικά φιαλίδια των 2mL μεταφέρεται 1 mL κυτταρικό αιώρημα. Τα φιαλίδια αυτά καταψύχονται σταδιακά, μέχρι να μεταφερθούν τελικά σε δοχείο υγρού αζώτου (-196°C).

Για την απόψυξη, το κρυογονικό φιαλίδιο φέρεται από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο των 37 °C. Όταν το περιεχόμενο υγροποιηθεί τοποθετείται θρεπτικό υλικό, έτσι ώστε να αραιωθεί περίπου 10 φορές και φυγοκεντρείται για 5 λεπτά σε 1800 rpm στους 20 °C. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και ξεπλένονται τα κύτταρα για ακόμα μια φορά. Το κυτταρικό ίζημα τοποθετείται σε φλάσκα και στη συνέχεια στον επωαστικό θάλαμο (37°C, 95% υγρασία, 5% CO₂).

2.3. Κυτταρομετρία ροής (FACS, Fluorescence-Activated Cell Sorting)

Αντιδραστήρια – όργανα:

Πλακίδια με 6 βοθρία (6 wells Plates)

Απόλυτη αιθανόλη παγωμένη (- 20°C)

Αναδευτήρας (Votrex)

Αντλία κενού

Βόειος ορός (FBS)

Αφυδατωμένα αφεψήματα βοτάνων (Αντωνιάδα, Δίκταμο, Τσάι του βουνού, Φασκόμηλο, Φλισκούνι)

Διάλυμα θρυψίνης-EDTA

Διάλυμα χρώσης: propidium iodide (PI), Tris, HCl, MgCl₂(1M), RNase A (10 mg/mL)

Ειδικά τριχοειδή σωληνάκια (FACS vials)

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

Καλλιεργητικό υλικό DMEM

Καταψύκτης -20° C

Κρυογονικά φιαλίδια
Κυτταρόμετρο ροής
Πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη
Πιπέτα 1000μL
Ρυθμιστικό διάλυμα PBS (non-sterilized και sterilized)
Σύριγγα αποστειρωμένη
Αποστειρωμένα συνθετικά φίλτρα με διάμετρο πόρων 0,20 μm
Φυγόκεντρος
Ψυγείο

Αρχή της μεθόδου:

Μέσω μιας υδροδυναμικά συγκλίνουσας ροής υγρού διέρχεται μία μονοχρωματική δέσμη ακτινοβολίας λείζερ. Στο σημείο όπου η δέσμη του φωτός διαπερνά τη ροή του υγρού υπάρχουν αρκετοί ανιχνευτές. Ένας από αυτούς βρίσκεται σε ευθυγράμμιση με τη δέσμη φωτός, κάποιοι άλλοι είναι κάθετοι σε αυτήν και ένας ή περισσότεροι είναι ανιχνευτές φθορισμού. Κάθε σωματίδιο (κύτταρο) διαπερνά τη δέσμη, σκεδάζει το φως προς κάποια κατεύθυνση, ενώ παράλληλα χημικές ενώσεις που βρίσκονται στο εσωτερικό ή στην επιφάνειά του, μπορούν να διεγερθούν και να εκπέμψουν ακτινοβολία άλλου μήκους κύματος (φθορισμός) από αυτό της πηγής. Τα σωματίδια που διαπερνούν τη δέσμη λείζερ είναι μεταξύ 0,2 και 150 μm. Η ακτινοβολία σκέδασης και φθορισμού ανιχνεύεται από τους ανιχνευτές. Η κυτταρομετρία ροής μετά από επεξεργασία των ανιχνευόμενων ακτινοβολιών, μπορεί να δώσει πληροφορίες σχετικά με τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου. Η πλάγια σκέδαση "SSC" (Side Scattering) εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (π.χ., σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων), ενώ η εμπρόσθια σκέδαση "FSC" επηρεάζεται από τον όγκο του κυττάρου.

Αναλυτική πορεία

1^η ημέρα: Μέτρηση του αριθμού των κυττάρων στις φλάσκες. Σε κάθε βοθρίο των plates φέρονται 5×10^3 κύτταρα και η αντίστοιχη ποσότητα θρεπτικού υλικού, ώστε στο κάθε

βοθρίο να έχουμε τελικό όγκο 3 ml. Γίνεται τοποθέτηση των plates στον επωαστικό θάλαμο διοξειδίου.

2^η ημέρα: Με την βοήθεια αντλίας κενού απομακρύνεται το καλλιεργητικό υλικό και στα βοθρία προστίθενται διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης που παρασκευάζονται με αναδιάλυση των αφυδατωμένων αφεψημάτων των βοτάνων. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων είναι 0,2 μg / mL, 0,6 μg / mL, 1 μg / mL. Ο τελικός όγκος στα plates είναι 3 ml. Στα control υπάρχει μόνο 3 ml θρεπτικό υλικό.

3^η ημέρα (24 ώρες): Γίνεται συλλογή του υπερκείμενου από την κυτταρική καλλιέργεια, ξεπλένεται με 1ml ρυθμιστικό διάλυμα PBS και προστίθενται 500 μL θρυψίνη. Ακολούθως τοποθετούνται στον επωαστήρα για 7 λεπτά. Συλλέγονται τα κύτταρα και φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά, στις 1000 rpm στους 25 °C. Με την βοήθεια της αντλίας κενού αδειάζει το υπερκείμενο με αναρρόφηση, προσθέτουμε 1ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS και με την βοήθεια της πιπέτας διαλύεται το κυτταρικό ίζημα. Όταν το κυτταρικό ίζημα διαλυθεί, φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά, στις 1000 rpm στους 25 °C. Ενώ τα κύτταρα αναδεύονται στον αναδευτήρα, προστίθεται 1 ml παγωμένη απόλυτη αιθανόλη (- 20 °C) και τοποθετούνται σε σκοτεινό μέρος στο ψυγείο, όπου μπορούν να διατηρηθούν έως 1 μήνα.

4^η ημέρα (48 ώρες): Ακολουθείται η ίδια διαδικασία με την 3^η ημέρα (24 ώρες)

5^η ημέρα (72 ώρες): Ακολουθείται η ίδια διαδικασία με την 3^η ημέρα (24 ώρες) και την 4^η ημέρα (48 ώρες).

6^η ημέρα: Γίνεται φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στους 4 °C στις 1200 rpm. Απορρίπτεται το υπερκείμενο με την βοήθεια της αντλίας κενού και ακολουθεί χρώση των κυττάρων με 500 μL διάλυμα χρώσης. Το διάλυμα χρώσης περιέχει 5 ml ρυθμιστικό διάλυμα PBS, 62 μL PI (4 mg/mL DMSO), 50 μL Tris.HCl (pH 7.5) 1M, 25 μL MgCl₂ (1M), 5 μL RNase A (10 mg / mL). Το διάλυμα χρώσης με τα κύτταρα μεταφέρονται σε κρυογονικά φιαλίδια των 2 mL. Μετά από 15 λεπτά, με την βοήθεια σύριγγας των 5 mL με πλαστικό φίλτρο με διάμετρο πόρων 0,20 μm τα τοποθετούμε σε ειδικά σωληνάκια (vials), τα οποία τοποθετούνται στο κυτταρόμετρο ροής.

2.4. Προσδιορισμός δραστικών ενώσεων οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS)

Αντιδραστήρια – Όργανα:

Οξική διχλωρο-φλουορεσκεΐνη (DCFH-DA, 2',7'-dichlorfluorescein diacetate)

Αναλυτής μικροπλάκων FLUOstar OPTICAL

Βόειος ορός

Αφυδατωμένα αφεψήματα βοτάνων (Αντωνάϊδα, Δίκταμο, Τσάι του βουνού, Φασκόμηλο, Φλισκούνη)

Επωαστικός θάλαμος

Καλλιεργητικό υλικό DMEM

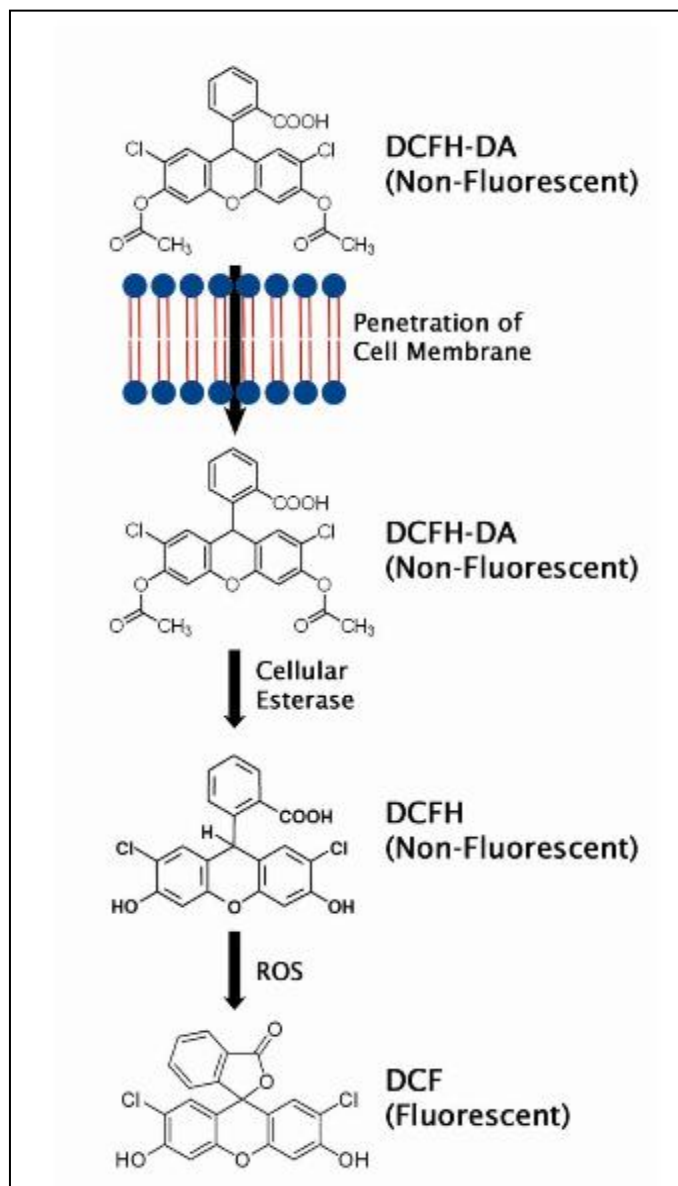
Πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη

Πολυστυρενικά πλακάκια επώασης των 96 θέσεων κατάλληλα για μέτρηση φθορισμού, με τοιχώματα μαύρου χρώματος

Ρυθμιστικό διάλυμα PBS

Αρχή της μεθόδου:

Προκειμένου να προσδιοριστούν τα βασικά επίπεδα των ενεργών μορφών οξυγόνου χρησιμοποιήθηκε η ένωση DCFH-DA (2',7'-dichlorfluorescein-diacetate). Η ένωση αυτή, λόγω της διακετυλομάδας DA, έχει λιπόφιλο χαρακτήρα και μπορεί να διαπερνά την μεμβράνη των κυττάρων. Στο εσωτερικό του κυττάρου, όμως, αποακετυλιώνεται από ειδικές κυτταροπλασματικές εστεράσες προς DCFH (Εικόνα 3.3) και αδυνατεί πλέον να περάσει ξανά την λιπιδική διπλοστιβάδα. Στη συνέχεια οξειδώνεται από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου του κυτταροπλάσματος παίρνοντας μια συγκεκριμένη δομή (DCF) που φθορίζει ($\lambda_{ex}=480\text{nm}$ $\lambda_{em}=520\text{nm}$). Ο φθορισμός της ένωσης προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά και με αυτό τον τρόπο εκτιμώνται ποσοτικά τα επίπεδα των ROS στο εσωτερικό του κυττάρου. Στην συγκεκριμένη μέθοδο χρησιμοποιούνται πλακάκια 96 θέσεων με μαύρα τοιχώματα για κάθε θέση, ώστε να μην επηρεάζεται από τον φθορισμό των διπλανών θέσεων



Εικόνα 3.3. Αρχή μεθόδου προσδιορισμού ενδοκυττάρων ROS
(<http://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/STA-342-ROS-assay-kit.pdf>)

Αναλυτική μέθοδος:

1^η ημέρα: Μέτρηση των κυττάρων και τοποθέτηση 10^4 κυττάρων σε κάθε βοθρία πολυστυρενικού τρυβλίου μαύρου χρώματος, το οποίο έχει 96 βοθρία. Ο τελικός όγκος στα βοθρία είναι 100 μL .

2^η ημέρα: Τοποθετούνται διαλύματα από αναδιάλυση των αφυδατωμένων αφεψημάτων των βοτάνων σε 3 συγκεντρώσεις 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Επίσης, στα βοθρία, υπάρχουν control και positive control (H_2O_2). Αφού επωαστούν για 5 ώρες και γίνει

προσθήκη DCFH-DA (35 μ L/ βοθρίο), επωάζονται για ακόμα 1 ώρα (37°C, 95% υγρασία, 5% CO₂).

Στην συνέχεια, τα τρυβλία ξεπλένονται με PBS και τοποθετούνται στον αναλυτή μικροπλακών FLUOstar OPTICAL.

2.5. Έλεγχος του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη μέθοδο MTT.

Αντιδραστήρια- όργανα

Αυτόματες πιπέττες (2-1000 μ L), tips

Βόειος ορός

Βότανα (Αντωνιάδα, Δίκταμο, Τσάι του βουνού, Φασκόμηλο, Φλισκούνη)

Διάλυμα ισοπροπυλικής αλκοόλης

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

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

Καλλιεργητικό υλικό DMEM

Πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη

Πολυστυρενικά τρυβλία επώασης των 96 βοθρίων

Φωτόμετρο ELISA (ELISA reader) με δυνατότητα μέτρησης φθορισμού

Αρχή της μεθόδου:

Ο έλεγχος του κυτταρικού πολλαπλασιασμού γίνεται με φωτομετρική μέθοδο με χρήση της χρωστικής MTT. Το ένζυμο αφυδρογονάση των μιτοχονδρίων διασπά τους κρυστάλλους τετραζολίου της κίτρινης χρωστικής MTT, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό πορφυρών κρυστάλλων. Αυτό συμβαίνει μόνο σε ζωντανά κύτταρα και η μέθοδος βασίζεται στη δράση της αφυδρογονάσης. Οι κρύσταλλοι που σχηματίζονται διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και συσσωρεύονται στον ενδοκυττάριο χώρο. Όταν προστεθεί το DMSO, οι κρύσταλλοι απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο αριθμός τους να είναι ανάλογος με τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων.

Αναλυτική πορεία:

Μετά τον προσδιορισμό των δραστικών ενώσεων οξυγόνου προστίθεται στο κάθε 20 μL βοθρίο MTT, το οποίο έχει διαλυτοποιηθεί σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Επωάζονται για 4 ώρες και στη συνέχεια γίνεται απομάκρυνση του υπερκειμένου. Προστίθεται 200 μL ισοπροπανόλης. Η διαλυτοποίηση των κρυστάλλων γίνεται με αυτόματη πιπέτα και επωάζονται ακόμα 5 λεπτά. Στη συνέχεια, με την βοήθεια του φωτόμετρου ELISA μετριέται η οπτική πυκνότητα στα 550 nm.

2.5.Στατιστική ανάλυση:

Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 19. Σύμφωνα με το Kolmogorov-Smirnov test υπήρχε κανονική κατανομή του πληθυσμού. Έγιναν συγκρίσεις κατά ζεύγη, με ανάλυση διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (one-way ANOVA), χρησιμοποιώντας το Tukey test (≥ 7 ομάδες σύγκρισης) ή το Bonferroni test (< 7 ομάδες σύγκρισης), ενώ το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $p < 0,05$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. Η επίδραση των αφεψημάτων από βότανα στον κυτταρικό κύκλο και στην απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου και του προστάτη

Ο καρκίνος χαρακτηρίζεται από διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού και απόπτωσης. Συγκεκριμένα, τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα, κυρίως λόγω κάποιας μετάλλαξης. Οι μέχρι σήμερα χρησιμοποιούμενοι παράγοντες για τη θεραπεία της ασθένειας, στοχεύουν στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, ενεργοποιώντας ενδογενείς μηχανισμούς αυτοκαταστροφής. Αξίζει να αναφερθεί ότι μεγάλο ποσοστό (~ 60%) των φαρμάκων που χορηγούνται σε καρκινοπαθείς, περιέχουν συστατικά που προέρχονται από το φυτικό βασίλειο. Τα φυτά και κυρίως τα αρωματικά φυτά περιέχουν πλήθος ενώσεων που θα μπορούσαν να δράσουν ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες. Στην πρόσφατη βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές που επισημαίνουν την ικανότητα τόσο των εκχυλισμάτων όσο και των αφεψημάτων των αρωματικών φυτών να αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων *in vitro*. Στην παρούσα ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα πειραμάτων τα οποία κατέγραψαν την ικανότητα των αφεψημάτων που μελετήθηκαν να επάγουν την απόπτωση και να επιδρουν στα στάδια του κυτταρικού κύκλου καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου και του προστάτη, ερμηνεύοντας εν μέρει την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Πίνακας 3.1 Μέσος όρος κατανομής των HT29 κυττάρων στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου

control	Μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (mean ± stdev)			
χρόνος (h)	G0/G1	S	G2/M	Απόπτωση
24	46.44 ± 2.11	31.92 ± 7.40	16.64 ± 0.29	0.85 ± 0.46
48	53.26 ± 0.13	34.26 ± 0.01	12.48 ± 0.14	1.95 ± 1.95
72	65.55 ± 1.29	27.17 ± 0.82	7.28 ± 0.44	0.35 ± 0.35

Στον Πίνακα 3.1 παρουσιάζεται η κατανομή του πληθυσμού των HT29 κυττάρων στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου μετά από 24, 48 και 72 h καλλιέργειας χωρίς την επίδραση κάποιου αφεψήματος (control καλλιέργεια). Η πλειοψηφία των κυττάρων βρίσκεται στη φάση G0/G1, όπως άλλωστε ήταν αναμενόμενο, καθώς η φάση αυτή

καταλαμβάνει το μεγαλύτερο ποσοστό του κυτταρικού κύκλου. Επιπρόσθετα, αξίζει να σημειωθεί ότι η συσσώρευση των κυττάρων στην G0/G1 φάση αυξάνεται με τον χρόνο καλλιέργειάς τους (46.44%, 53.26%, 65,55% μετά από 24, 48 και 72h καλλιέργειας αντίστοιχα). Η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού λόγω της συσσώρευσης στη φάση αυτή είναι αποτέλεσμα της επαφής των κυττάρων όσο αυξάνεται η πληθυσμιακή πυκνότητα. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα, δεν εισέρχονται στη φάση G1, όπου πραγματοποιούνται οι απαραίτητες διεργασίες ώστε να διαιρεθούν, πιθανώς λόγω της 100% κάλυψης της επιφάνειας του τρυβλίου που έχει ως αποτέλεσμα τα κύτταρα να βρίσκονται σε άμεση επαφή ή/ και της επικράτησης μη ευνοϊκών συνθηκών στην καλλιέργεια (έλλειψη θρεπτικών συστατικών, αυξητικών, μιτογόνων ή άλλων παραγόντων) (Borel et al., 2002).

Πίνακας 3.2 Ικανότητα του αφεψήματος από Αντωναΐδα να επάγει την απόπτωση και να επιδρά στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου HT29 κυττάρων. Με έντονο επισημαίνεται η ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς ($p < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δεν προστέθηκε αφέψημα και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα για 24, 48 και 72 h σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

Βότανο		Μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση (mean $\pm$ stdev)			
χρόνος (h)	Αντωναΐδα συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	G0/G1	S	G2/M	Απόπτωση
24	1.0	30.73 $\pm$ 1.42	51.45 $\pm$ 0.64	17.83 $\pm$ 0.78	1.65 $\pm$ 1.13
	0.6	29.59 $\pm$ 0.50	54.38 $\pm$ 1.19	15.64 $\pm$ 1.28	1.65 $\pm$ 1.15
	0.2	28.08 $\pm$ 1.14	52.08 $\pm$ 0.93	19.85 $\pm$ 0.21	0.39 $\pm$ 0.06
48	1.0	50.77 $\pm$ 0.13	34.61 $\pm$ 0.70	14.62 $\pm$ 0.57	0.50 $\pm$ 0.50
	0.6	48.18 $\pm$ 1.21	36.84 $\pm$ 0.77	15.00 $\pm$ 0.43	0.50 $\pm$ 0.03
	0.2	47.67 $\pm$ 1.08	34.59 $\pm$ 0.83	17.74 $\pm$ 0.26	1.30 $\pm$ 1.30
72	1.0	65.57 $\pm$ 1.45	27.55 $\pm$ 0.66	6.90 $\pm$ 0.80	4.38 $\pm$ 3.06
	0.6	63.23 $\pm$ 0.66	29.10 $\pm$ 2.48	7.68 $\pm$ 1.81	2.04 $\pm$ 1.04
	0.2	63.93 $\pm$ 0.60	29.30 $\pm$ 0.63	6.77 $\pm$ 0.02	0.53 $\pm$ 0.12

Στον Πίνακα 3.2 παρουσιάζεται η επίδραση του αφεψήματος από Αντωναΐδα στα HT29 μετά από 24, 48 και 72 h σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Παρατηρείται ότι η παρουσία του αφεψήματος στην καλλιέργεια HT29 (σε όλες τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν) οδηγεί σε στατιστικά σημαντική αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση S και παράλληλη μείωση του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται στην φάση G0/G1 μετά από 24 h επώασης. Η επίδραση του αφεψήματος δεν βρέθηκε να σχετίζεται με το χρόνο επώασης, καθώς τα ποσοστά των κυττάρων στις

φάσεις του κυτταρικού κύκλου δε παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με τις αντίστοιχες της control καλλιέργειας (Πιν. 3.1), με εξαίρεση την αύξηση που παρατηρήθηκε στη φάση G2/M μετά από 48 h επώασης στη μικρότερη συγκέντρωση που μελετήθηκε.

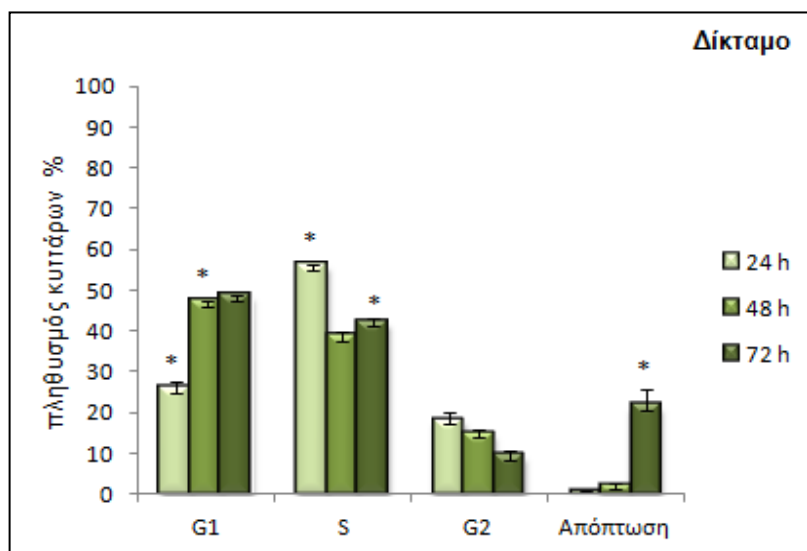
Το αφέψημα δε φάνηκε να προκαλεί την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου. Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί η σχέση δοσο-εξάρτησης που παρατηρήθηκε στην απόπτωση μετά από 72 h επώασης, παρόλο που η σχέση αυτή δεν επαληθεύεται και στατιστικά.

Πίνακας 3.3 Ικανότητα του αφεψήματος από Δίκταμο να επάγει την απόπτωση και να επιδρά στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου HT29 κυττάρων. Με έντονο επισημαίνεται η ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς ($p < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δεν προστέθηκε αφέψημα και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα για 24, 48 και 72 h σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

χρόνος (h)	Βότανο Δίκταμο συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση (mean $\pm$ stdev)			
		G0/G1	S	G2/M	Απόπτωση
24	1.0	25.95 $\pm$ 1.14	56.02 $\pm$ 0.16	18.04 $\pm$ 1.30	0.47 $\pm$ 0.14
	0.6	26.57 $\pm$ 1.95	51.56 $\pm$ 2.52	21.88 $\pm$ 0.58	5.75 $\pm$ 0.87
	0.2	27.94 $\pm$ 0.94	45.67 $\pm$ 0.80	26.40 $\pm$ 0.14	4.91 $\pm$ 1.99
48	1.0	46.92 $\pm$ 0.30	38.37 $\pm$ 1.16	14.73 $\pm$ 0.85	2.07 $\pm$ 0.48
	0.6	49.10 $\pm$ 0.03	34.04 $\pm$ 0.18	16.86 $\pm$ 0.14	12.79 $\pm$ 4.85
	0.2	51.57 $\pm$ 0.55	31.68 $\pm$ 0.11	16.76 $\pm$ 0.43	2.39 $\pm$ 1.04
72	1.0	48.55 $\pm$ 0.05	42.04 $\pm$ 0.83	9.42 $\pm$ 0.79	21.45 $\pm$ 2.95
	0.6	60.17 $\pm$ 2.05	27.22 $\pm$ 2.72	12.61 $\pm$ 0.66	3.88 $\pm$ 3.88
	0.2	61.83 $\pm$ 0.04	24.37 $\pm$ 0.37	13.80 $\pm$ 0.41	1.13 $\pm$ 0.09

Συνεχίζοντας, στον Πίνακα 3.3 παρουσιάζονται τα αντίστοιχα αποτελέσματα μετά από επίδραση με το αφέψημα από Δίκταμο. Παρατηρήθηκε ότι το αφέψημα προκαλεί στατιστικά σημαντικά αύξηση του ποσοστού των κυττάρων στις φάσεις S και G2/M ύστερα από επώαση 24 h σε όλες τις συγκεντρώσεις. Η αναστολή στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου φαίνεται να επηρεάζεται από τη συγκέντρωση του αφεψήματος, ενώ όπου αυτό δε γίνεται αντιληπτό είναι λόγω της επίτευξης plateau ήδη από τη δόση των 0.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Η αναστολή στη φάση G2/M διατηρήθηκε μετά από 48 και 72 h επώασης με το αφέψημα ενώ στη φάση S εντοπίζεται μόνο στις 72 h.

Το αφέψημα από Δίκταμο προκαλεί απόπτωση των HT29 κυττάρων με δόσο- και χρόνο- εξαρτώμενο τρόπο. Το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων είναι μεγαλύτερο του 20% μετά από 72 h επώασης στη συγκέντρωση 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Εικόνα 3.1). Τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να ερμηνεύσουν εν μέρει την αναστολή του πολλαπλασιασμού που έχει παρατηρηθεί βιβλιογραφικά για το αφέψημα από Δίκταμο.



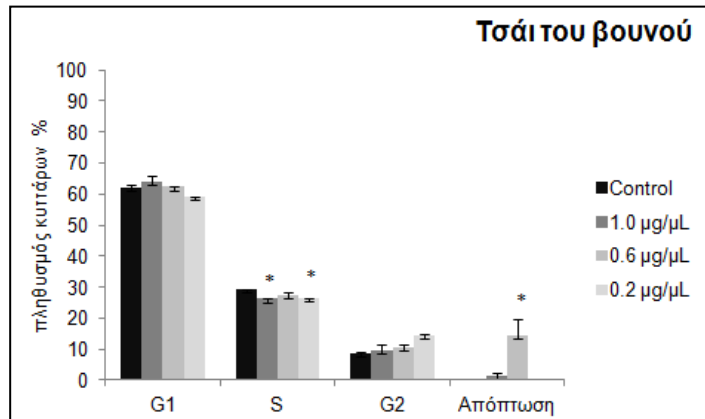
Εικόνα 3.1 Χρονοεξαρτώμενη επίδραση του αφεψήματος από Δίκταμο (1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) στην επαγωγή της απόπτωσης. Ο (*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0.05$) μεταξύ των κυττάρων που δεν έγινε επίδραση με το αφέψημα και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα για 24, 48 και 72 h

Πίνακας 3.4 Ικανότητα του αφεψήματος από Τσαί βουνού να επάγει την απόπτωση και να επιδρά στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου HT29 κυττάρων. Με έντονο επισημαίνεται η ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς ($p<0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δεν προστέθηκε αφέψημα και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα για 24, 48 και 72 h σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

Βότανο		Μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση (mean $\pm$ stdev)			
Τσαί βουνού συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)		G0/G1	S	G2/M	Απόπτωση
χρόνος (h)					
24	1.0	33.89 $\pm$ 0.09	53.72 $\pm$ 0.58	12.41 $\pm$ 0.50	10.24 $\pm$ 1.04
	0.6	31.03 $\pm$ 0.25	58.49 $\pm$ 1.00	10.49 $\pm$ 0.76	0.25 $\pm$ 0.25
	0.2	31.88 $\pm$ 2.19	54.48 $\pm$ 1.97	13.63 $\pm$ 0.22	0.09 $\pm$ 0.09
48	1.0	47.16 $\pm$ 1.81	39.50 $\pm$ 0.90	13.35 $\pm$ 0.91	0.39 $\pm$ 0.39
	0.6	47.86 $\pm$ 1.39	38.50 $\pm$ 1.33	13.64 $\pm$ 0.06	0.47 $\pm$ 0.47
	0.2	45.65 $\pm$ 0.78	39.16 $\pm$ 0.16	15.20 $\pm$ 0.61	0.00 $\pm$ 0.00
72	1.0	64.01 $\pm$ 1.45	26.22 $\pm$ 0.03	9.77 $\pm$ 1.41	1.53 $\pm$ 0.74
	0.6	62.31 $\pm$ 0.18	27.21 $\pm$ 0.90	10.48 $\pm$ 0.73	14.29 $\pm$ 3.92
	0.2	59.00 $\pm$ 0.13	21.38 $\pm$ 4.84	14.62 $\pm$ 0.29	0.24 $\pm$ 0.14

Στον Πίνακα 3.4. παρουσιάζεται η επίδραση του αφεψήματος από Τσαί του βουνού στα HT29 μετά από 24, 48, 72 h επώασης σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1.0

μg/μL. Η παρουσία του αφεψήματος οδηγεί σε αναστολή της φάσης S με αποτέλεσμα τα κύτταρα να συσσωρεύονται στη φάση αυτή. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύεται από το γεγονός ότι το ποσοστό των κυττάρων στη φάση S απουσία αφεψήματος (control καλλιέργεια) είναι 31.92 ενώ μετά την επίδραση αφεψήματος από Τσάι το ποσοστό των κυττάρων στη φάση αυτή είναι μεγαλύτερο από 50%. Η



Εικόνα 3.2: Η επίδραση του αφεψήματος από Τσάι του βουνού στα στάδια του κυτταρικού κύκλου και η επαγωγή της απόπτωσης μετά από 72 h επώασης στις συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1.0 μg/μL. Ο (*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων που δεν έγινε επίδραση με το αφέψημα και εκείνων που έγινε επίδραση αφεψήματος.

παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται, καθώς παρατηρείται παράλληλη μείωση του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται στην φάση G0/G1 μετά από 24 h επώασης. Η συσσώρευση των κυττάρων στη φάση S δε βρέθηκε να σχετίζεται με τον χρόνο επώασης καθώς μετά από 72 h επώασης με το αφέψημα παρατηρείται αναστολή στη φάση G2/M, ενώ ταυτόχρονα το ποσοστό των καρκινικών κυττάρων στη φάση S μειώνεται. Η αναστολή στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου βρέθηκε ανεξάρτητη των συγκεντρώσεων του αφεψήματος που χορηγήθηκαν στα κύτταρα.

Η ικανότητα του αφεψήματος από Τσάι του βουνού να επάγει την απόπτωση παρατηρείται στην περίπτωση που τα κύτταρα επωάστηκαν με 1.0 μg/μL αφεψήματος για 24 h και με 0.6 μg/μL για 72 h. Το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων κυμαίνεται από 10 έως 15 % στις 24 και 72 h επώασης αντίστοιχα.

Πίνακας 3.5 Ικανότητα του αφεψήματος από Φασκόμηλο να επάγει την απόπτωση και να επιδρά στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου HT29 κυττάρων. Με έντονο επισημαίνεται η ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς ($p < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δεν προστέθηκε αφέψημα και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα για 24, 48 και 72 h σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

Βότανο		Μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση (mean $\pm$ stdev)			
χρόνος (h)	Φασκόμηλο συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	G0/G1	S	G2/M	Απόπτωση
24	1.0	33.90 $\pm$ 1.71	57.23 $\pm$ 0.66	10.38 $\pm$ 0.87	3.78 $\pm$ 3.78
	0.6	30.58 $\pm$ 0.10	54.77 $\pm$ 0.43	14.65 $\pm$ 0.33	0.04 $\pm$ 0.04
	0.2	31.96 $\pm$ 1.08	53.38 $\pm$ 1.31	15.67 $\pm$ 0.76	0.02 $\pm$ 0.01
48	1.0	43.61 $\pm$ 0.40	46.57 $\pm$ 0.05	9.84 $\pm$ 0.46	0.03 $\pm$ 0.03
	0.6	45.01 $\pm$ 0.89	40.65 $\pm$ 0.67	14.34 $\pm$ 0.22	0.00 $\pm$ 0.00
	0.2	46.97 $\pm$ 0.27	35.83 $\pm$ 0.10	15.71 $\pm$ 1.13	0.00 $\pm$ 0.00
72	1.0	67.79 $\pm$ 0.33	28.45 $\pm$ 0.27	3.77 $\pm$ 0.07	12.06 $\pm$ 2.43
	0.6	68.32 $\pm$ 0.44	25.24 $\pm$ 0.61	6.45 $\pm$ 0.17	4.94 $\pm$ 3.00
	0.2	69.69 $\pm$ 0.63	24.56 $\pm$ 0.47	5.76 $\pm$ 0.16	8.06 $\pm$ 3.84

Στον Πίνακα 3.5 παρατίθενται οι τιμές κατανομής των κυττάρων στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου ύστερα από επίδραση με αφέψημα από Φασκόμηλο στα HT29, μετά από 24, 48, 72 h και σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Μετά από 24 h επώασης των καρκινικών κυττάρων με αφέψημα από Φασκόμηλο παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση του ποσοστού των κυττάρων στη φάση S και μείωση του αντίστοιχου στη φάση G0/G1, σε σχέση με την control καλλιέργεια, σε όλες τις συγκεντρώσεις. Ερμηνεία της παρατήρησης αυτής μπορεί να είναι ότι το αφέψημα από Φασκόμηλο προκαλεί αναστολή της φάσης S άρα και συσσώρευση των κυττάρων σε αυτή τη φάση. Η συσσώρευση των κυττάρων στη φάση S με δόσοεξαρτώμενο τρόπο γίνεται αντιληπτή και μετά από 48 h επώασης με το αφέψημα καθώς το ποσοστό των κυττάρων στη φάση αυτή είναι από 4 έως 36% μεγαλύτερο από το αντίστοιχο της control καλλιέργειας. Αξίζει να σημειωθεί, ότι μετά από 72 h επώασης παρατηρήθηκε συσσώρευση των κυττάρων στη φάση ηρεμίας (G0/G1), καθώς αυξάνεται το ποσοστό των καρκινικών κυττάρων σε αυτή τη φάση. Η αναστολή στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου μετά από 72 h επώασης δεν φαίνεται να επηρεάζεται από τις συγκεντρώσεις του αφεψήματος.

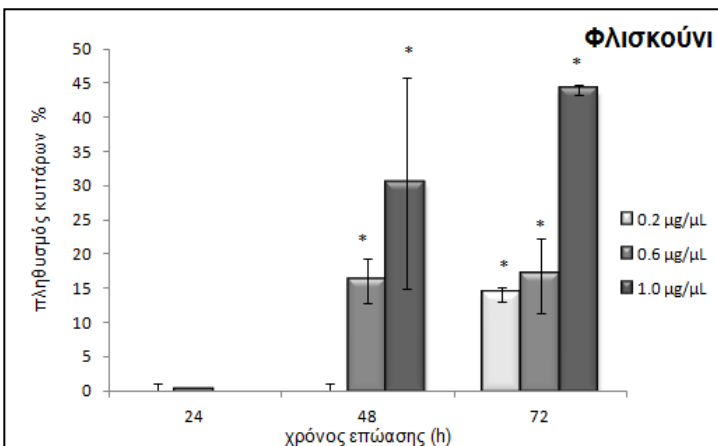
Αναφορικά με την ικανότητα του αφεψήματος από Φασκόμηλο να επάγει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου βρέθηκε περίπου 12% μετά από επώαση για 72 h για τη συγκέντρωση 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Πίνακας 3.6 Ικανότητα του αφεψήματος από Φλισκούνη να επάγει την απόπτωση και να επιδρά στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου HT29 κυττάρων. Με έντονο επισημαίνεται η ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς ($p < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δεν προστέθηκε αφέψημα και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα για 24, 48 και 72 h σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

Βότανο		Μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση (mean $\pm$ stdev)			
χρόνος (h)	Φλισκούνη συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	G0/G1	S	G2/M	Απόπτωση
24	1.0	40.88 $\pm$ 2.04	51.54 $\pm$ 2.19	7.59 $\pm$ 0.15	0.00 $\pm$ 0.00
	0.6	37.78 $\pm$ 1.42	52.05 $\pm$ 0.27	10.18 $\pm$ 1.15	0.05 $\pm$ 0.01
	0.2	32.62 $\pm$ 0.07	49.86 $\pm$ 0.39	17.52 $\pm$ 0.32	0.00 $\pm$ 0.00
48	1.0	43.69 $\pm$ 2.36	44.49 $\pm$ 0.98	11.83 $\pm$ 3.34	30.38 $\pm$ 10.94
	0.6	48.31 $\pm$ 0.43	41.84 $\pm$ 0.59	9.85 $\pm$ 0.16	16.17 $\pm$ 2.32
	0.2	49.64 $\pm$ 0.49	35.07 $\pm$ 0.39	15.31 $\pm$ 0.10	0.00 $\pm$ 0.00
72	1.0	45.61 $\pm$ 4.99	42.21 $\pm$ 0.84	12.19 $\pm$ 4.15	43.94 $\pm$ 0.52
	0.6	60.37 $\pm$ 0.16	31.28 $\pm$ 0.36	8.36 $\pm$ 0.20	16.83 $\pm$ 3.80
	0.2	67.25 $\pm$ 0.09	23.32 $\pm$ 0.42	9.44 $\pm$ 0.33	14.09 $\pm$ 0.47

Στον Πίνακα 3.6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά από επίδραση στα HT29 αφεψήματος από Φλισκούνη σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ για 24, 48 και 72 h. Παρατηρήθηκε ότι το αφέψημα προκαλεί αναστολή στη φάση S του κυτταρικού κύκλου των HT29 και στους τρεις χρόνους επώασης στη μεσαία και μεγάλη συγκέντρωση. Η επίδραση φαίνεται να μην παρουσιάζει δοσο-εξαρτώμενη σχέση, καθώς μετά από επώαση των HT29 κυττάρων με 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ αφεψήματος από Φλισκούνη, παρατηρήθηκε αναστολή στη φάση G2/M και G0/G1 μετά από 24 και 72 h αντίστοιχα και όχι στη φάση S.

Το αφέψημα από Φλισκούνη προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο των HT29 κυττάρων επάγοντας την απόπτωση με χρόνο- και δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Η ικανότητά του να επηρεάζει τη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων κυμαίνεται από 30 έως 45 % του κυτταρικού πληθυσμού στη συγκέντρωση 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ μετά από επώαση 48 και 72 h αντίστοιχα (Εικόνα 3.3). Αξίζει να σημειωθεί ότι η επαγόμενη από το αφέψημα απόπτωση είναι της τάξης του 15% ακόμα και μετά από επίδραση με τη χαμηλή συγκέντρωση (0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ύστερα από 72 h.



Εικόνα 3.3 Χρονο- και δόσο- εξαρτώμενη επίδραση του αφεψήματος από Δίκταμο στην επαγωγή της απόπτωσης. Ο (*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων που δεν έγινε επίδραση με το αφέψημα και εκείνων που επώαστηκαν με το αφέψημα σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1.0

Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι προηγούμενη μελέτη (**Κουνδουράκη, 2013**) κατέδειξε ότι τα αφεψήματα των βοτάνων που μελετήθηκαν δεν παρουσίασαν τοξικότητα (<5% τοξικότητα) σε φυσιολογικά μονοπύρηννα περιφερικού αίματος (PBMC) στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία (0.2, 0.6, και 1.0 μg/μL). Η ικανότητα των αφεψημάτων από Αντωναΐδα, Δίκταμο, Τσάι του βουνού, Φασκόμηλο, Φλισκούνη να αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία (**Kogiannou et al., 2013**) (**Kaliora et al., 2014**). Συγκεκριμένα, το αφέψημα από Αντωναΐδα φάνηκε να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% ήδη από τις 24h σε όλες τις συγκεντρώσεις (0.2, 0.6, 1.0 μg/μL). Το αφέψημα από Δίκταμο, φαίνεται να μειώνει το πολλαπλασιασμό στα HT29 σε ποσοστό μεγαλύτερο από 90%, για τη συγκέντρωση 1.0 μg/μL μετά από 24h επώασης. Μεγάλη ικανότητα στην αναστολή του πολλαπλασιασμού βρέθηκε και για το Τσάι Βουνού και το Φασκόμηλο ενώ για το αφέψημα από Φλισκούνη παρατηρήθηκε χρόνο-εξαρτώμενη σχέση στην αναστολή του πολλαπλασιασμού, μόνο στις μεγάλες συγκεντρώσεις (**Kogiannou et al., 2013**) (**Kaliora et al., 2014**).

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου τα αφεψήματα από Αντωναΐδα, Δίκταμο, Τσάι του βουνού, Φασκόμηλο, Φλισκούνη αναστέλλουν το κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επάγουν την απόπτωση δεν έχει ακόμα μελετηθεί. Υπάρχουν όμως μελέτες οι οποίες εξέτασαν την επίδραση οργανικών εκχυλισμάτων των βοτάνων αλλά και μεμονωμένων φυτοχημικών που περιέχουν σε διάφορες καρκινικές σειρές.

Οι Garcia και συνεργάτες μελέτησαν την επίδραση δυο εκχυλισμάτων από Φασκόμηλο (80%v/v EtOH-H₂O και υδατικό διάλυμα ExtAS) σε διάφορες κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου. Στη μελέτη αυτή παρατηρήθηκαν χαμηλότερα ποσοστά απόπτωσης στις κυτταρικές σειρές με φυσιολογικά κύτταρα του παχέος εντέρου (Hek-293, MRC-5) σε σύγκριση με καρκινικές σειρές του παχέος εντέρου (Hep-2, Hela, HT29, A-549, A375). Το εκχύλισμα από φασκόμηλο (EtOH-H₂O) επάγει την απόπτωση στα φυσιολογικά κύτταρα του παχέος εντέρου (Hek-293, MRC-5) στο 52% και 53% αντίστοιχα, ενώ στις καρκινικές σειρές του παχέος εντέρου (Hep-2, Hela, HT29, A-549, A375) το ποσοστό της απόπτωσης κυμαίνεται από 65 έως 85%. Η ικανότητα του υδατικού εκχυλίσματος από Φασκόμηλο να επάγει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (Hep-2, Hela, HT29, A-549, A375) κυμαίνεται από 75-85%. **(Garcia et al., 2016).**

Μια πρόσφατη μελέτη (**Jaganathan et al 2013**) ανέδειξε την ικανότητα του π-κουμαρικού οξέος, ενός υδροξυκιναμικού οξέος, να επάγει την απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου (HCT15). Συγκεκριμένα, η παρουσία του π-κουμαρικού οξέος (1400 $\mu\text{mol/L}$) προκάλεσε αύξηση της απόπτωσης με χρονο-εξαρτώμενο τρόπο. Το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων ήταν 5.98, 16.46 και 37,45% μετά από επώαση 12, 24 και 48 h, αντίστοιχα **(Jaganathan et al., 2013).**

Ακολούθως, αναφορικά με τη δράση του καφεϊκού οξέος, σε έρευνα του Jaganathan (2012) παρατηρήθηκε δοσο- και χρονο- εξαρτώμενη σχέση στην επαγωγή της απόπτωσης μετά από επώαση με καφεϊκό οξύ σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου (HCT15). **(Jaganathan, 2012)**

Το γαλλικό οξύ φαίνεται να προκαλεί χρονο- και δοσο- εξαρτώμενη μείωση της βιωσιμότητας των Caco-2. Ένας πιθανός μηχανισμός μείωσης της βιωσιμότητας λόγω της δράσης του γαλλικού οξέος είναι η ικανότητα του να επάγει την παραγωγή των ROS. Επίσης, παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση του ποσοστού των κυττάρων στη φάση S μετά από 16 και 72 ώρες επώασης, και στη φάση G0/G1 μετά από 48 και 72 ώρες επώασης με γαλλικό οξύ. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου το γαλλικό οξύ προκαλεί αναστολή της φάσης G0/G1 είναι η μείωση των επιπέδων της κυκλίνης D1.

Επιπρόσθετα, η αναστολή στη φάση S του κυτταρικού κύκλου δείχνει ότι το γαλλικό οξύ μπορεί να συμβάλλει στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και σε άλλες φάσεις του κυτταρικού κύκλου (Forester et al., 2014).

Πίνακας 3.7. Μέσος όρος κατανομής των PC3 κυττάρων στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου

control χρόνος (h)	Μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση (mean $\pm$ stdev)			
	G0/G1	S	G2/M	Απόπτωση
24	54.44 $\pm$ 3.53	3.83 $\pm$ 5.41	41.74 $\pm$ 1.89	0.95 $\pm$ 1.32
48	46.20 $\pm$ 0.00	6.12 $\pm$ 0.00	47.68 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
72	57.13 $\pm$ 0.87	2.84 $\pm$ 0.52	40.04 $\pm$ 0.36	0.00 $\pm$ 0.00

Στον Πίνακα 3.7. παρουσιάζεται ο μέσος όρος κατανομής των PC3 κυττάρων στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου μετά από 24, 48, 72 h καλλιέργειας χωρίς την επίδραση κάποιου αφεψήματος (control καλλιέργεια). Όμοια με τα HT29, η πλειοψηφία των κυττάρων βρίσκεται στη φάση G0/G1 καθώς η φάση αυτή καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του κυτταρικού κύκλου, όπως αναφέρθηκε νωρίτερα. Το ποσοστό των κυττάρων της control καλλιέργειας στη φάση S είναι μικρό, που υποδεικνύει ότι μικρό ποσοστό των κυττάρων εισέρχονται στη φάση διπλασιασμού του γενετικού τους υλικού, ενώ ένα μεγάλο ποσοστό των κυττάρων βρίσκεται στη φάση διαίρεσης. Όπως ήταν αναμενόμενο τα ποσοστά της απόπτωσης απουσία αφεψήματος είναι 0%.

Πίνακας 3.8 Ικανότητα του αφεψήματος από Αντωναΐδα να επάγει την απόπτωση και να επιδρά στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου PC3 κυττάρων. Με έντονο επισημαίνεται η ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς ($p < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δεν προστέθηκε αφέψημα και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα για 24, 48 και 72 h σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

Βότανο		Μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση (mean $\pm$ stdev)			
χρόνος (h)	Αντωναΐδα	G0/G1	S	G2/M	Απόπτωση
	συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)				
24	1.0	49.48 $\pm$ 1.61	1.29 $\pm$ 1.82	49.24 $\pm$ 0.22	1.08 $\pm$ 0.13
	0.6	47.35 $\pm$ 1.61	6.00 $\pm$ 0.66	46.66 $\pm$ 0.95	0.84 $\pm$ 0.27
	0.2	45.62 $\pm$ 0.16	4.61 $\pm$ 6.52	49.78 $\pm$ 6.36	1.10 $\pm$ 0.42
48	1.0	48.76 $\pm$ 1.00	5.44 $\pm$ 0.43	45.81 $\pm$ 0.57	0.61 $\pm$ 0.83
	0.6	50.14 $\pm$ 1.12	5.12 $\pm$ 0.13	44.74 $\pm$ 1.24	0.00 $\pm$ 0.00
	0.2	50.43 $\pm$ 0.43	4.08 $\pm$ 1.27	45.51 $\pm$ 0.84	0.00 $\pm$ 0.00
72	1.0	57.50 $\pm$ 0.47	3.23 $\pm$ 1.27	39.28 $\pm$ 0.79	0.13 $\pm$ 0.18
	0.6	56.46 $\pm$ 0.66	2.06 $\pm$ 0.06	41.48 $\pm$ 0.61	0.00 $\pm$ 0.00
	0.2	58.49 $\pm$ 1.09	2.65 $\pm$ 0.01	38.86 $\pm$ 1.07	0.00 $\pm$ 0.00

Στον Πίνακα 3.8 καταγράφεται η επίδραση του αφεψήματος από Αντωναΐδα στα PC3 ύστερα από 24, 48, 72 h επώασης σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Η παρουσία του αφεψήματος από Αντωναΐδα στα κύτταρα δεν είχε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τα κύτταρα χωρίς την επίδραση αφεψήματος. Παρόλα αυτά υπήρχε τάση για συσσώρευση των κυττάρων στις φάσεις G2/M και G0/G1 μετά από 24 και 48 h επώασης αντίστοιχα.

Πίνακας 3.9 Ικανότητα του αφεψήματος από Δίκταμο να επάγει την απόπτωση και να επιδρά στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου PC3 κυττάρων. Με έντονο επισημαίνεται η ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς ($p < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δεν προστέθηκε αφέψημα και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα για 24, 48 και 72 h σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

Βότανο		Μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση (mean $\pm$ stdev)			
χρόνος (h)	Δίκταμο	G0/G1	S	G2/M	Απόπτωση
	συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)				
24	1.0	51.41 $\pm$ 0.55	0.00 $\pm$ 0.00	48.59 $\pm$ 0.55	1.11 $\pm$ 0.20
	0.6	48.87 $\pm$ 0.06	0.11 $\pm$ 0.15	46.47 $\pm$ 6.54	0.58 $\pm$ 0.17
	0.2	48.11 $\pm$ 0.78	4.67 $\pm$ 6.60	51.79 $\pm$ 0.93	0.98 $\pm$ 0.22
48	1.0	49.53 $\pm$ 0.57	15.29 $\pm$ 1.48	35.18 $\pm$ 0.93	0.00 $\pm$ 0.00
	0.6	50.26 $\pm$ 0.14	10.87 $\pm$ 0.39	38.88 $\pm$ 0.53	0.00 $\pm$ 0.00
	0.2	47.75 $\pm$ 0.16	9.20 $\pm$ 0.42	43.06 $\pm$ 0.59	0.53 $\pm$ 0.75
72	1.0	52.77 $\pm$ 3.01	14.38 $\pm$ 4.14	32.85 $\pm$ 7.16	4.35 $\pm$ 6.15
	0.6	61.59 $\pm$ 2.89	7.22 $\pm$ 0.06	31.20 $\pm$ 2.96	0.00 $\pm$ 0.00
	0.2	55.22 $\pm$ 0.06	4.94 $\pm$ 1.31	39.85 $\pm$ 1.36	1.60 $\pm$ 1.64

Στον Πίνακα 3.9. παρουσιάζεται η επίδραση του αφεψήματος από Δίκταμο στα PC3 στις 24, 48, 72 h επώασης με συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Μετά από 24 h επώασης παρατηρήθηκε αναστολή της φάσης G2/M με αποτέλεσμα τη συσσώρευση σε αυτή τη φάση με ταυτόχρονη μείωση των φάσεων G0/G1 και S παρόλο που δεν επαληθεύτηκε στατιστικά. Σε αντίθεση με τις 24h επώασης, στις 48 και 72 h φάνηκε ότι το αφέψημα από Δίκταμο αναστέλλει τη φάση S με παράλληλη μείωση των φάσεων G0/G1 και G2/M. Αυτό επιβεβαιώθηκε στατιστικά μόνο στη συγκέντρωση 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ στη φάση G2/M και S στις 48 και 72 h επώασης αντίστοιχα.

Στον Πίνακα 3.10 παρουσιάζεται η επίδραση του αφεψήματος από Τσάι του βουνού στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη μετά από 24, 48, 47 h επώασης με συγκεντρώσεις 0.2, 0.6, 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Το αφέψημα από Τσάι του βουνού φαίνεται να μην επιφέρει αλλαγές στην κατανομή των κυττάρων στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου.

Πίνακας 3.10 Ικανότητα του αφεψήματος Τσάι του βουνού να επάγει την απόπτωση και να επιδρά στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου PC3 κυττάρων. Με έντονο επισημαίνεται η ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς ($p < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δεν προστέθηκε αφέψημα και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα για 24, 48 και 72 h σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

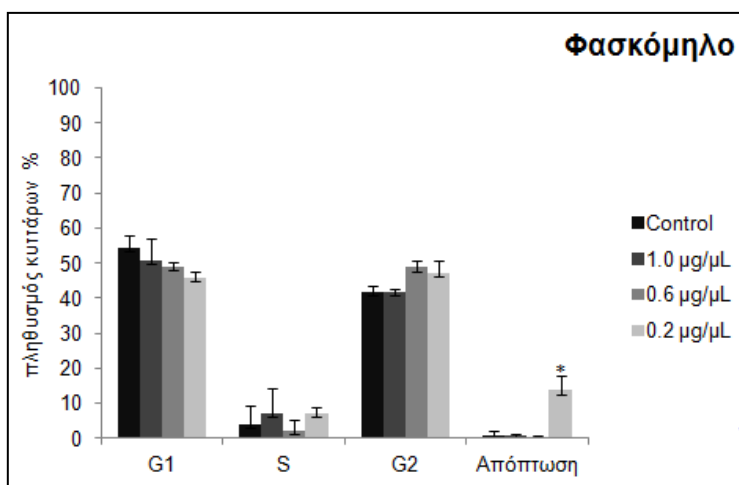
Βότανο		Μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση (mean $\pm$ stdev)			
χρόνος (h)	Τσάι του βουνού	G0/G1	S	G2/M	Απόπτωση
	συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)				
24	1.0	48.87 $\pm$ 8.02	13.32 $\pm$ 1.68	37.81 $\pm$ 6.34	2.95 $\pm$ 0.43
	0.6	49.76 $\pm$ 0.35	0.00 $\pm$ 0.00	50.25 $\pm$ 0.35	3.38 $\pm$ 4.43
	0.2	49.55 $\pm$ 6.10	9.13 $\pm$ 2.91	41.33 $\pm$ 6.81	1.26 $\pm$ 1.77
48	1.0	48.41 $\pm$ 1.86	9.86 $\pm$ 7.16	41.74 $\pm$ 5.30	0.39 $\pm$ 0.54
	0.6	48.11 $\pm$ 0.37	5.62 $\pm$ 1.29	46.28 $\pm$ 0.92	0.00 $\pm$ 0.00
	0.2	49.59 $\pm$ 1.15	5.52 $\pm$ 1.76	44.91 $\pm$ 2.92	0.49 $\pm$ 0.19
72	1.0	57.32 $\pm$ 1.75	2.50 $\pm$ 0.36	39.57 $\pm$ 0.56	4.75 $\pm$ 6.71
	0.6	57.65 $\pm$ 0.30	2.79 $\pm$ 0.25	40.19 $\pm$ 1.40	1.05 $\pm$ 0.10
	0.2	58.33 $\pm$ 0.06	2.59 $\pm$ 1.27	39.10 $\pm$ 1.20	0.80 $\pm$ 1.13

Ο Πίνακας 3.11 απεικονίζει την επίδραση του αφεψήματος από Φασκόμηλο στα PC3 κύτταρα. Μετά από 24 h επώασης παρατηρείται μια μικρή αύξηση του ποσοστού των κυττάρων στη φάση G2/M, ενώ στη φάση G0/G1 υπάρχει μείωση του ποσοστού των κυττάρων σε σύγκριση με την control καλλιέργεια χωρίς ωστόσο τα αποτελέσματα αυτά να επαληθεύονται στατιστικά.

Πίνακας 3.11 Ικανότητα του αφεψήματος Φασκόμηλο να επάγει την απόπτωση και να επιδρά στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου PC3 κυττάρων. Με έντονο επισημαίνεται η ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς ($p < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δεν προστέθηκε αφέψημα και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα για 24, 48 και 72 h σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

Βότανο		Μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση (mean $\pm$ stdev)			
χρόνος (h)	Φασκόμηλο	G0/G1	S	G2/M	Απόπτωση
	συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)				
24	1.0	50.93 $\pm$ 6.16	7.18 $\pm$ 7.01	41.90 $\pm$ 0.85	0.80 $\pm$ 0.34
	0.6	49.09 $\pm$ 1.32	2.18 $\pm$ 3.08	48.73 $\pm$ 1.77	0.42 $\pm$ 0.58
	0.2	45.80 $\pm$ 1.80	6.97 $\pm$ 1.74	47.24 $\pm$ 3.54	13.63 $\pm$ 4.38
48	1.0	45.27 $\pm$ 4.41	18.07 $\pm$ 7.16	36.67 $\pm$ 2.75	0.00 $\pm$ 0.00
	0.6	48.36 $\pm$ 1.36	7.37 $\pm$ 1.66	44.28 $\pm$ 0.31	0.01 $\pm$ 0.01
	0.2	50.89 $\pm$ 1.87	5.28 $\pm$ 0.95	43.83 $\pm$ 0.92	0.00 $\pm$ 0.00
72	1.0	55.74 $\pm$ 0.27	9.59 $\pm$ 1.92	34.68 $\pm$ 1.65	0.00 $\pm$ 0.00
	0.6	58.03 $\pm$ 0.99	4.50 $\pm$ 1.40	37.47 $\pm$ 2.39	0.00 $\pm$ 0.00
	0.2	56.77 $\pm$ 0.49	4.17 $\pm$ 0.33	39.07 $\pm$ 0.81	0.00 $\pm$ 0.00

Το αφέψημα από Φασκόμηλο φαίνεται να μην επιφέρει αλλαγές στην κατανομή των καρκινικών κυττάρων του προστάτη στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου μετά από 48 και 72 h επώασης. Η ικανότητα του αφεψήματος να επάγει τον κυτταρικό θάνατο



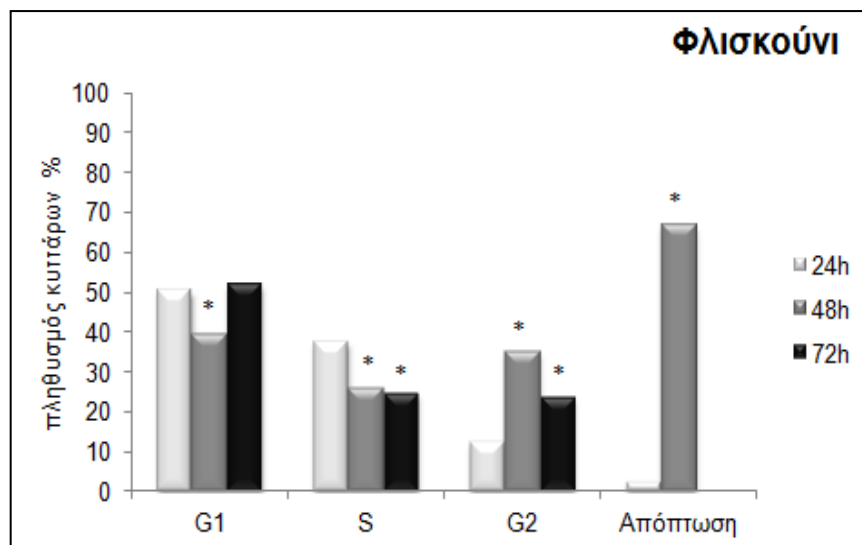
παρατηρήθηκε μόνο μετά από επώαση 24 h στη συγκέντρωση 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ όπου το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων ξεπερνά το 13 % (Εικόνα 3.4)

Εικόνα 3.4. Η επίδραση του αφεψήματος από Φασκόμηλο στα στάδια του κυτταρικού κύκλου και στην επαγωγή της απόπτωσης μετά από 72 h επώασης στις συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Ο (*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων που δεν έγινε επίδραση με το αφέψημα και εκείνων που έγινε επίδραση αφεψήματος

Πίνακας 3.12 Ικανότητα του αφεψήματος Φλισκούνη να επάγει την απόπτωση και να επιδρά στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου PC3 κυττάρων. Με έντονο επισημαίνεται η ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς ($p < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δεν προστέθηκε αφέψημα και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα για 24, 48 και 72 h σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

Βότανο		Μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση (mean $\pm$ stdev)			
Φλισκούνη		G0/G1	S	G2/M	Απόπτωση
χρόνος (h)	συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)				
24	1.0	50.28 $\pm$ 2.16	12.25 $\pm$ 6.44	37.48 $\pm$ 4.28	2.18 $\pm$ 2.05
	0.6	51.31 $\pm$ 1.99	0.00 $\pm$ 0.00	48.69 $\pm$ 1.99	5.90 $\pm$ 7.42
	0.2	42.76 $\pm$ 4.14	14.37 $\pm$ 4.87	42.89 $\pm$ 0.73	1.81 $\pm$ 1.05
48	1.0	39.30 $\pm$ 2.39	34.84 $\pm$ 11.99	25.87 $\pm$ 9.60	66.62 $\pm$ 13.20
	0.6	48.40 $\pm$ 0.15	18.05 $\pm$ 3.74	33.56 $\pm$ 3.89	15.44 $\pm$ 21.83
	0.2	47.27 $\pm$ 0.16	11.54 $\pm$ 1.26	41.19 $\pm$ 1.10	0.13 $\pm$ 0.18
72	1.0	51.83 $\pm$ 2.45	23.69 $\pm$ 4.62	24.48 $\pm$ 2.18	0.00 $\pm$ 0.00
	0.6	62.81 $\pm$ 0.31	10.24 $\pm$ 1.48	26.96 $\pm$ 1.78	0.03 $\pm$ 0.04
	0.2	58.31 $\pm$ 1.10	5.02 $\pm$ 0.04	36.68 $\pm$ 1.07	0.90 $\pm$ 0.50

Στον Πίνακα 3.12. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την μετά από επίδραση του αφεψήματος από Φλισκούνη στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη. Το ποσοστό των κυττάρων στη φάση S αυξάνεται, ενώ παρατηρήθηκε παράλληλη μείωση στις φάσεις G0/G1 και G2/M, μετά από 48 h επώασης. Παρομοίως



Εικόνα 3.5. Η επίδραση του αφεψήματος από Φλισκούνη μετά από 24, 48, 72 h επώασης στη συγκέντρωση 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Το (*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία δεν έγινε επίδραση με το αφέψημα και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα

και μετά από 72 h επώασης παρατηρήθηκε αναστολή των φάσεων S και G0/G1 με αποτέλεσμα τη συσσώρευση των κυττάρων σε αυτές τις φάσεις, παρόλο που στατιστικά επαληθεύτηκε μόνο στις φάσεις S, G2/M και G0/G1, S, G2/M στις συγκεντρώσεις 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ και 0.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ αντίστοιχα.

Το αφέψημα από Φλισκούνη προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο, επάγοντας την απόπτωση μετά από 48 h επώασης. Η ικανότητα του να επηρεάζει την βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων μετά από 48 h επώασης στη μεγαλύτερη συγκέντρωση ξεπερνά το 66%.

Η ικανότητα των αφεψημάτων από Αντωναΐδα, Δίκταμο, Τσάι του βουνού, Φασκόμηλο, Φλισκούνη να αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία **(Kogiannou et al., 2013) (Kaliora et al., 2014)**.

Στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη φαίνεται ότι η επίδραση αφεψήματος από Αντωναΐδα με συγκέντρωση 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ και 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ προκάλεσε μείωση περίπου 50% μετά από 24h. Σημαντικό είναι να τονισθεί ότι παρατηρήθηκε μείωση μεγαλύτερη του 95% για τη συγκέντρωση 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ στις 72h, γεγονός που δηλώνει τη μεγάλη δραστηριότητα που εμφανίζει το συγκεκριμένο αφέψημα. 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. Τα αποτελέσματα από την επίδραση του αφεψήματος που προέρχεται από το Τσάι Βουνού αναδεικνύουν την ικανότητά του να δρα με δόσο- και χρόνο- εξαρτώμενο τρόπο. 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 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ και υπολογίστηκε στο 57%. Ολοκληρώνοντας, υπάρχει ξεκάθαρα θετική συσχέτιση μεταξύ της αναστολής του πολλαπλασιασμού με τη δόση και το χρόνο επώασης, για το αφέψημα από Φλισκούνη. 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 **(Kogiannou et al., 2013) (Kaliora et al., 2014)**.

Δεν υπάρχουν μελέτες οι οποίες εξετάζουν την επίδραση των αφεψημάτων από βότανα στα στάδια του κυτταρικού κύκλου και στην απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη, υπάρχουν όμως μελέτες οι οποίες εξέτασαν την επίδραση μεμονωμένων βιοδραστικών συστατικών στα στάδια του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε διάφορες καρκινικές σειρές.

Η μελέτη των Eroğlu και συνεργατών που αφορά την επίδραση φερουλικού οξέος σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη (PC3 και LNCaP), κατέδειξε την χημειοπροστατευτική του δράση μέσω της ικανότητάς του να μειώνει την έκφραση της CCND1 (cyclin D1) και να επάγει την έκφραση της RB1 (**Eroğlu et al., 2015**).

Ο ρόλος της κερκετίνης ως χημειοπροστατευτικού παράγοντα έχει μελετηθεί εκτενώς σε ποικίλες καρκινικές σειρές. Αρχικά σε μελέτη των Kang και Liang (1997), βρέθηκε ότι η επώαση λευχαιμικών κυττάρων HL-60 με κερκετίνη προκαλεί δόσοεξαρτώμενη αναστολή του πολλαπλασιασμού σε συγκεντρώσεις 10 μ M και 80 μ M. Ο πιθανός μηχανισμός βρέθηκε να είναι η αναστολή της φάσης G2/M καθώς παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού των κυττάρων στη φάση αυτή, από 7.6% σε 12.4%, 19.1% και 23.5%, μετά από επώαση με κερκετίνη με συγκεντρώσεις 20, 40, 60 μ M αντίστοιχα, ενώ παρατηρήθηκε παράλληλη μείωση του αριθμού των κυττάρων στη φάση G0/G1 από 46.2 % σε 40.2%, 32.1% και 34.5% στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις (**Kang & Liang, 1997**). Η χημειοπροστατευτική δράση της κερκετίνης επαληθεύεται σε μια ακόμα μελέτη σε ανθρώπινα λευχαιμικά κύτταρα (U937). Στη μελέτη αυτή φάνηκε ότι η κερκετίνη προκαλεί χρονοεξαρτώμενη αύξηση της φάσης G2/M μετά από επώαση σε συγκέντρωση 20 μ M η οποία σχετίστηκε με αλλαγές στις συγκεντρώσεις των cdc2, cdk4, cdk2 πρωτεϊνών (**Csokay et al., 1997**). Σε παρόμοια μελέτη οι Lee και συνεργάτες, κατάληξαν στο συμπέρασμα, ότι η κερκετίνη παρουσιάζει διπλό μηχανισμό δράσης στον κυτταρικό κύκλο στα U937 κύτταρα αναστέλλοντας τη φάση G2/M και προκαλώντας απόπτωση μέσω της ενεργοποίησης της κασπάσης (**Lee et al., 2006**). Επιπρόσθετα, η κερκετίνη φαίνεται να αλληλεπιδρά στο μονοπάτι σηματοδότησης της PI3K/Akt και να αναστέλλει την ανάπτυξη αδενοκαρκινώματος στο παχύ έντερο, στον μαστό και στην εξέλιξη της λευχαιμίας αναστέλλοντας την cdk2, η οποία αποτελεί σημείο ελέγχου της μετάβασης από τη φάση G1 στη φάση S (**Beattie, et al., 2005**) (**Neto CC, 2007a**) (**Rao, et al., 2007**) (**Stoner, et al., 2008**). Ταυτοχρόνως, η κερκετίνη προκαλεί την απόπτωση, επάγοντας την ενεργοποίηση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών p21, Bak, Bax, του κυτοχρώματος C και της κασπάσης 3 και την απενεργοποίηση την έκφραση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 (**Folmer et al., 2014**).

Ο ρόλος της καμφερόλης στον κυτταρικό κύκλο και στην επαγωγή της απόπτωσης καρκινικών κυττάρων είναι εκτενώς μελετημένος. Οι Bestwick και συνεργάτες (**Bestwick et al., 2007**) μελέτησαν τις επιπτώσεις της καμφερόλης στα HL-60 ανθρώπινα λευχαιμικά κύτταρα και ανέφεραν δόσοεξαρτώμενη αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, μέσω της επίδρασης στα στάδια του κυτταρικού κύκλου, η οποία φάνηκε να τροποποιείται από τη συγκέντρωση επώασης. Συγκεκριμένα, η καμφερόλη μετά από επώαση σε συγκέντρωση 10μM προκάλεσε αναστολή στη φάση S, ενώ σε συγκέντρωση 50 μM προκάλεσε αύξηση της φάσης G2/M του κυτταρικού κύκλου.

Στη συνέχεια οι Woo και συνεργάτες ανέδειξαν τη χημειοπροστατευτική δράση της χρυσίνης στα U937 κύτταρα, επάγοντας την απόπτωση. Ο μηχανισμός δράσης της φάνηκε να είναι είτε η ενεργοποίηση της κασπάσης-3 είτε η απενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης PI3K/Akt. (**Woo et al., 2004**)

Ένα άλλο είδος του γένους *Sideritis* μελετήθηκε από τους Jeremic και συνεργάτες, οι οποίοι παρατήρησαν την επαγωγή της απόπτωσης καρκινικών κυττάρων του εγκεφάλου (C6) ύστερα από επώαση με εκχύλισμα πτητικών συστατικών από Τσάι του βουνού (*Sidetiris scardica*). Στην ίδια μελέτη, το οργανικό εκχύλισμα του βοτάνου προκάλεσε αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στη φάση G2/M, ενώ το εκχύλισμα των πτητικών συστατικών ανέστειλε τη μετάβαση των κυττάρων από τη φάση S στη φάση G2/M (**Jeremic et al., 2013**).

3.2. Η επίδραση των αφεψημάτων από βότανα στις δραστικές ενώσεις οξυγόνου(ROS)

Οι δραστικές ενώσεις οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS) παράγονται κατά τη φυσιολογική μεταβολική λειτουργία των κυττάρων από ποικίλα υποκυτταρικά οργανίδια όπως τα μιτοχόνδρια, μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας, όπου τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στον τελικό τους αποδέκτη, το μοριακό οξυγόνο, μέσω αναπνευστικών συγκροτημάτων που βρίσκονται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, το ενδοπλασματικό δίκτυο κ.α. Η παραγωγή των ROS είναι υψηλής

σημασίας, καθώς διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση πολλών φυσιολογικών διαδικασιών, αποτελώντας μέρος των σηματοδοτικών μονοπατιών που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την κυτταρική επιβίωση, την φλεγμονή κ.α. Ωστόσο, η αυξημένη παραγωγή τους μπορεί να προκαλέσει την καταστροφή σημαντικών βιομορίων και κυττάρων μεταβάλλοντας την ομοιόσταση του οργανισμού με αποτέλεσμα την εκδήλωση ασθενειών. Επιπρόσθετα, είναι γνωστό ότι πολλοί τύποι καρκίνου χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα δραστικών ενώσεων οξυγόνου. Η αυξημένη παραγωγή ROS που χαρακτηρίζει τα καρκινικά κύτταρα, σε σχέση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά, είναι αποτέλεσμα κυρίως του υψηλού μεταβολισμού και της ανάγκης πολλαπλασιασμού τους. Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι υπάρχει ένα κατώτερο και ένα ανώτερο όριο παρουσίας ROS για τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων ανάμεσα στα οποία τα κύτταρα παρουσιάζουν βέλτιστη λειτουργία. Τα όρια αυτά έχουν βρεθεί μετατοπισμένα στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά. Για την επιβίωσή τους σε αυτές τις συνθήκες αυξημένου οξειδωτικού στρες τα καρκινικά κύτταρα έχουν αναπτύξει ένα αμυντικό σύστημα που περιλαμβάνει ενίσχυση του αντιοξειδωτικού τους μηχανισμού. Εάν διαταραχθεί αυτή η ισορροπία, είτε μέσω μείωσης της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων/μορίων, είτε μέσω περαιτέρω αύξησης των ROS μπορεί να προκληθεί θάνατος των καρκινικών κυττάρων, κυρίως μέσω της επαγωγής της απόπτωσης. Η παραπάνω διαπίστωση αποτέλεσε το έναυσμα για την ανάπτυξη διαφορετικών στρατηγικών για την αντιμετώπιση του καρκίνου. Συγκριμένα, η έρευνα κλίνει στην αναγνώριση ουσιών που μπορούν να μεταβάλουν την οξειδωτική κατάσταση των καρκινικών κυττάρων οδηγώντας τα σε κυτταρική βλάβη και κατ' επέκταση στο θάνατο, λειτουργώντας ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες. Στην παρούσα ενότητα περιγράφονται τα αποτελέσματα από την επίδραση αφεψημάτων από Αντωναΐδα, Δίκταμο, Τσάι βουνού, Φασκόμηλο και Φλισκούνη στα επίπεδα οξειδωτικού στρες μέσω της μελέτης των ενδοκυτταρικών ROS στις κυτταρικές σειρές HT29 και PC3.

Πίνακας 3.13. Ενδοκυττάρια επίπεδα των ROS (μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση) στα HT29. Με έντονο επισημαίνεται η ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς σε σχέση με το αρνητικό control ($p < 0.05$)

Control	Ενδοκυττάρια επίπεδα ROS (μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση) (RFU)
αρνητικό	29630 $\pm$ 5531
θετικό	89413 $\pm$ 6466

Τα HT29 παράγουν υψηλά επίπεδα δραστικών ενώσεων οξυγόνου (αρνητικό control), όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.13. Ταυτόχρονα με τα μη διεγερμένα κύτταρα, μελετήθηκαν τα επίπεδα των ROS παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (θετικό control). Η προσθήκη του υπεροξειδίου του υδρογόνου ως θετικού μάρτυρα αποσκοπεί στην αξιολόγηση της δράσης των αφεψημάτων. Όπως ήταν αναμενόμενο το H_2O_2 προκαλεί περεταίρω αύξηση των επιπέδων των ROS της τάξης του 200%.

Πίνακας 3.14. Επίδραση του αφεψήματος από Αντωναΐδα στα ενδοκυττάρια επίπεδα των ROS στα HT29. Με έντονο παρουσιάζονται οι τιμές που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το αρνητικό control ($p < 0.05$)

Βότανο	Συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Ενδοκυττάρια επίπεδα ROS (μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση) (RFU)
Αντωναΐδα	1.0	52003 $\pm$ 12350
	0.6	55453 $\pm$ 8495
	0.2	58764 $\pm$ 2935

Στον Πίνακα 3.14 παρουσιάζεται η επίδραση του αφεψήματος από Αντωναΐδα στα ενδοκυττάρια επίπεδα των ROS στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου. Η παρουσία του αφεψήματος από Αντωναΐδα σε τρεις συγκεντρώσεις (0.2, 0.6 και 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) στα HT29 οδηγεί σε στατιστικά σημαντική αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων ROS (της τάξης του 100%) σε σχέση με τα κύτταρα χωρίς την επίδραση αφεψήματος. Τα επίπεδα της αύξησης δεν παρουσιάζουν θετική συσχέτιση με τη συγκέντρωση που αφεψήματος (δοσοεξάρτηση), καθώς παρατηρήθηκε η επίτευξη plateau ήδη από τη συγκέντρωση 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Πίνακας 3.15. Επίδραση του αφεψήματος από Δίκταμο στα ενδοκυττάρια επίπεδα των ROS στα HT29. Με έντονο παρουσιάζονται οι τιμές που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το αρνητικό control ($p < 0.05$)

Βότανο	Συγκέντρωση (μg/μL)	Ενδοκυττάρια επίπεδα ROS (μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση) (RFU)
Δίκταμο	1.0	72892 $\pm$ 7511
	0.6	61307 $\pm$ 10694
	0.2	40931 $\pm$ 7651

Ακολουθώντας, στον Πίνακα 3.15 παρουσιάζονται τα αντίστοιχα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά από την επίδραση του αφεψήματος από Δίκταμο. Το αφέψημα από Δίκταμο αύξησε τα επίπεδα των ενδοκυττάρων ROS στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου και στις τρεις συγκεντρώσεις (0.2, 0.6 και 1.0 μg/μL) με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Η παρουσία του αφεψήματος σε συγκέντρωση 1.0 μg/μL και 0.6 μg/μL στην καλλιέργεια αυξάνει τα ενδοκυττάρια επίπεδα περίπου 2,5 και 2 φορές αντίστοιχα σε σχέση με το αρνητικό control.

Πίνακας 3.16. Επίδραση του αφεψήματος από Τσάι βουνού στα ενδοκυττάρια επίπεδα των ROS στα HT29. Με έντονο παρουσιάζονται οι τιμές που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το αρνητικό control ($p < 0.05$)

Βότανο	Συγκέντρωση (μg/μL)	Ενδοκυττάρια επίπεδα ROS (μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση) (RFU)
Τσάι βουνού	1.0	89685 $\pm$ 18637
	0.6	64298 $\pm$ 10694
	0.2	36839 $\pm$ 5264

Συνεχίζοντας, στον Πίνακα 3.16 παρουσιάζεται η επίδραση του αφεψήματος από Τσάι του βουνού. Συγκρίνοντας τα επίπεδα των ενδοκυττάρων ROS στα κύτταρα χωρίς την επίδραση αφεψήματος με τα κύτταρα που προστέθηκε το αφέψημα από Τσάι του βουνού παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων των ROS με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Η μεταβολή αυτή επαληθεύτηκε στατιστικά στις συγκεντρώσεις 0.6 και 1.0 μg/μL με αύξηση των επιπέδων των ενδοκυττάρων ROS δύο και τρεις φορές αντίστοιχα σε σχέση με αρνητικό control. Αξίζει να σημειωθεί ότι η αύξηση που παρατηρήθηκε μετά από επίδραση με 1.0 μg/μL ήταν παρόμοια με αυτή του θετικού control.

Πίνακας 3.17. Επίδραση του αφεψήματος από Φασκόμηλο στα ενδοκυττάρια επίπεδα των ROS στα HT29. Με έντονο παρουσιάζονται οι τιμές που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το αρνητικό control ($p < 0.05$)

Βότανο	Συγκέντρωση (μg/mL)	Ενδοκυττάρια επίπεδα ROS (μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση) (RFU)
Φασκόμηλο	1.0	95906 $\pm$ 5004
	0.6	59698 $\pm$ 11972
	0.2	35101 $\pm$ 5125

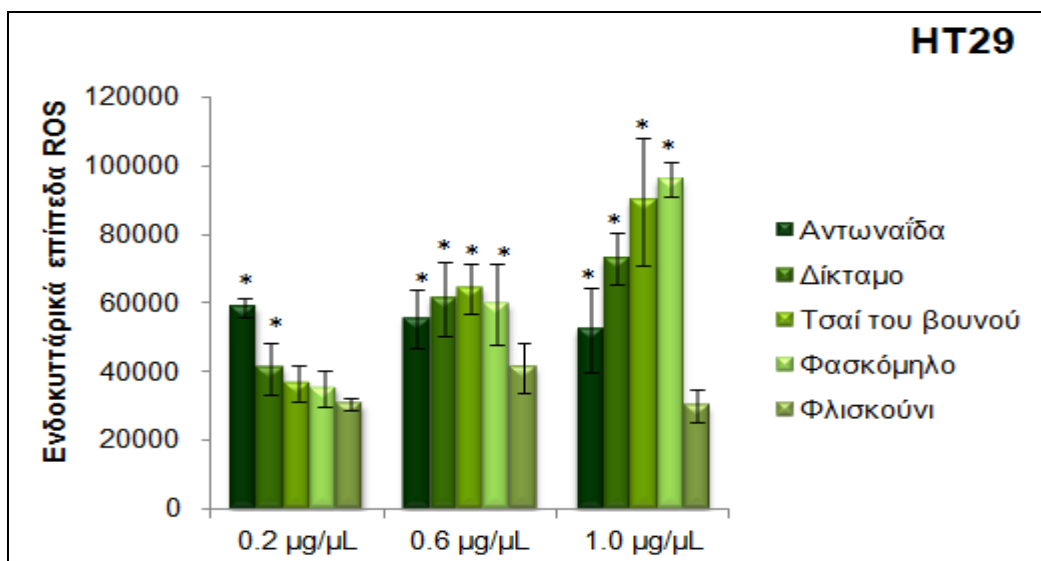
Ακολουθώς, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.17, η επίδραση του αφεψήματος από Φασκόμηλο στα HT29 παρουσιάζει περίπου την ίδια εικόνα με αυτή από το αφέψημα από Τσάι του βουνού. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε δόσοεξαρτώμενη αύξηση των επιπέδων των ROS, η οποία επαληθεύεται στατιστικά στις συγκεντρώσεις 1.0 και 0.6 μg/mL. Αξίζει να σημειωθεί ότι στη συγκέντρωση 1.0 μg/mL, τα ενδοκυττάρια επίπεδα ήταν μεγαλύτερα από αυτά που παρατηρήθηκαν μετά την επίδραση του H₂O₂.

Πίνακας 3.18. Επίδραση του αφεψήματος από Φλισκούνη στα ενδοκυττάρια επίπεδα των ROS στα HT29. Με έντονο παρουσιάζονται οι τιμές που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το αρνητικό control ($p < 0.05$)

Βότανο	Συγκέντρωση (μg/mL)	Ενδοκυττάρια επίπεδα ROS (μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση) (RFU)
Φλισκούνη	1.0	29974 $\pm$ 4726
	0.6	41337 $\pm$ 7250
	0.2	30503 $\pm$ 1817

Συνεχίζοντας, ο Πίνακας 3.18 παραθέτει την επίδραση του αφεψήματος από Φλισκούνη στα ενδοκυττάρια επίπεδα των ROS στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου. Η επίδραση του αφεψήματος από Φλισκούνη στα HT29 οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων των ROS και στις τρεις συγκεντρώσεις σε σχέση με το αρνητικό control καλλιέργεια, παρόλο αυτά δεν επαληθεύτηκε στατιστικά.

Μελετώντας συνολικά τα αποτελέσματα (Εικόνα 3.6), τα ροφήματα των βοτάνων κατατάσσονται κατά σειρά αυξανόμενης δραστηριότητας ως προς την δυνατότητα να επάγουν οξειδωτικό στρες στα HT29 ως εξής: Φασκόμηλο < Τσάι βουνού < Δίκταμο < Αντωνάϊδα < Φλισκούνη.



Εικόνα 3.6: Ενδοκυττάρια επίπεδα ROS σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου μετά από επίδραση με αφεψήματα από Αντωνναΐδα, Δίκταμο, Τσαΐ βουνού, Φασκόμηλο και Φλισκούνη σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1.0 µg/µL. Ο (*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων που δεν έγινε επίδραση με το αφέψημα και εκείνων που επωάστηκαν με το αφέψημα

Πίνακας 3.19. Ενδοκυττάρια επίπεδα των ROS (μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση) στα PC3. Με έντονο επισημαίνεται η ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς σε σχέση με το αρνητικό control ($p < 0.05$)

Control	Ενδοκυττάρια επίπεδα ROS (μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση) (RFU)
Αρνητικό	9249 $\pm$ 1607
Θετικό	14142 $\pm$ 1920

Όσο αναφορά τα καρκινικά κύτταρα του προστάτη, επίσης παράγουν υψηλά επίπεδα ROS, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.19 (αρνητικό control). Τα επίπεδα των ROS μελετήθηκαν επίσης και με την παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (θετικό control), η προσθήκη του οποίου στην καλλιέργεια προκάλεσε περαιτέρω αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων ROS, της τάξης περίπου 60%.

Πίνακας 3.20. Επίδραση του αφεψήματος από Αντωναΐδα στα ενδοκυττάρια επίπεδα των ROS στα PC3. Με έντονο παρουσιάζονται οι τιμές που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το αρνητικό control ($p < 0.05$)

Βότανο	Συγκέντρωση (μg/μL)	Ενδοκυττάρια επίπεδα ROS (μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση) (RFU)
Αντωναΐδα	1.0	12894 $\pm$ 1718
	0.6	10012 $\pm$ 569
	0.2	8675 $\pm$ 1470

Στον Πίνακα 3.20 παρουσιάζεται η επίδραση του αφεψήματος από Αντωναΐδα στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη. Η παρουσία του αφεψήματος από Αντωναΐδα στη συγκέντρωση 1.0 μg/μL αυξάνει τα ενδοκυττάρια επίπεδα των δραστικών ενώσεων οξυγόνου σε σχέση με το αρνητικό control χωρίς η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική, ενώ στις συγκεντρώσεις 0.2 και 0.6 μg/μL δεν υπάρχουν εμφανείς αλλαγές στα επίπεδα του οξειδωτικού στρες.

Πίνακας 3.21. Επίδραση του αφεψήματος από Δίκταμο στα ενδοκυττάρια επίπεδα των ROS στα PC3. Με έντονο παρουσιάζονται οι τιμές που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το αρνητικό control ($p < 0.05$)

Βότανο	Συγκέντρωση (μg/μL)	Ενδοκυττάρια επίπεδα ROS (μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση) (RFU)
Δίκταμο	1.0	14365 $\pm$ 1317
	0.6	11014 $\pm$ 809
	0.2	9010 $\pm$ 1728

Συνεχίζοντας, στον Πίνακα 3.21 παρουσιάζεται η επίδραση του αφεψήματος από Δίκταμο στα ενδοκυττάρια επίπεδα των δραστικών ενώσεων οξυγόνου στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη. Η επίδραση του αφεψήματος από Δίκταμο στη συγκέντρωση 1.0 μg/μL προκάλεσε σημαντική αύξηση των ROS, παρόμοια με του θετικού control. Σημαντική είναι και η παρατήρηση ότι δεν παρουσιάζεται μεταβολή στα επίπεδα οξειδωτικού στρες μετά από επώαση με 0.2 μg/μL αφεψήματος, ενώ στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις η μεταβολή στα επίπεδα οξειδωτικού στρες παρουσίασε θετική συσχέτιση με τη συγκέντρωση του αφεψήματος (αύξηση της τάξης του 19 και 55% για τις συγκεντρώσεις 0.6 και 1.0 μg/μL, αντίστοιχα). Υπάρχει λοιπόν ένα κατώτερο όριο συγκέντρωσης πάνω από το οποίο το αφέψημα από Δίκταμο μεταβάλλει την οξειδωτική κατάσταση των καρκινικών κυττάρων του προστάτη.

Πίνακας 3.22. Επίδραση του αφεψήματος από Τσάι βουνού στα ενδοκυττάρια επίπεδα των ROS στα PC3. Με έντονο παρουσιάζονται οι τιμές που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το αρνητικό control ($p < 0.05$)

Βότανο	Συγκέντρωση (μg/mL)	Ενδοκυττάρια επίπεδα ROS (μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση) (RFU)
Τσάι βουνού	1.0	22972 $\pm$ 1807
	0.6	12344 $\pm$ 3307
	0.2	7032 $\pm$ 243

Στον Πίνακα 3.22 παρουσιάζεται η επίδραση του αφεψήματος από Τσάι του βουνού. Το αφέψημα προκάλεσε αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων των ROS στη συγκέντρωση 1.0 μg/mL κατά περίπου 2.5 φορές, σχέση με την καλλιέργεια χωρίς την επίδραση βοτάνου (αρνητικό control). Αξίζει να αναφερθεί ότι τα επίπεδα οξειδωτικού στρες βρέθηκαν υψηλότερα και από αυτά του θετικού control. Στις συγκεντρώσεις 0.6 και 1.0 μg/mL το αφέψημα αυξάνει τα ενδοκυττάρια επίπεδα των δραστικών ενώσεων οξυγόνου με δόσοεξαρτώμενο τρόπο παρόλο που στατιστικά σημαντικά αποδείχθηκε μόνο για τη συγκέντρωση 1.0 μg/mL. Τέλος, παρατηρήθηκε ότι η παρουσία του αφεψήματος από Τσάι του βουνού στη συγκέντρωση 0.2 μg/mL μειώνει τα επίπεδα των ROS στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη σε σύγκριση με το αρνητικό control.

Πίνακας 3.23. Επίδραση του αφεψήματος από Φασκόμηλο στα ενδοκυττάρια επίπεδα των ROS στα PC3. Με έντονο παρουσιάζονται οι τιμές που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το αρνητικό control ($p < 0.05$)

Βότανο	Συγκέντρωση (μg/mL)	Ενδοκυττάρια επίπεδα ROS (μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση) (RFU)
Φασκόμηλο	1.0	30682 $\pm$ 2593
	0.6	12430 $\pm$ 3253
	0.2	7044 $\pm$ 394

Ακολούθως, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.23 η επίδραση του αφεψήματος από Φασκόμηλο στα PC3 παρουσιάζει περίπου την ίδια εικόνα με αυτή του αφεψήματος από Τσάι του βουνού, μεταβάλλοντας τα επίπεδα των ROS με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Συγκεκριμένα, το αφέψημα από Φασκόμηλο στη συγκέντρωση 1.0 μg/mL αύξησε τα ενδοκυττάρια επίπεδα ROS κατά περίπου 3.5 φορές σε σχέση με το αρνητικό control ενώ ήταν δυο φορές υψηλότερα από αυτά που καταγράφηκαν για το θετικό. Επίσης, αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων των δραστικών ενώσεων οξυγόνου

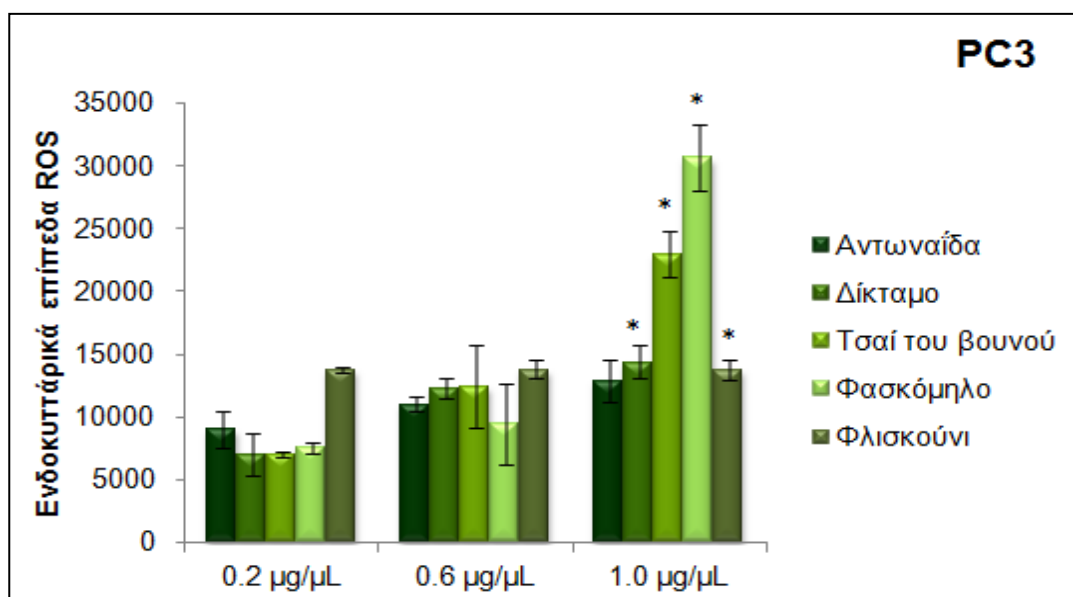
παρατηρήθηκε για τη συγκέντρωση 0.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Τέλος, στη συγκέντρωση 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά τα ενδοκυττάρια επίπεδα.

Πίνακας 3.24. Επίδραση του αφεψήματος από Φλισκούνη στα ενδοκυττάρια επίπεδα των ROS στα PC3. Με έντονο παρουσιάζονται οι τιμές που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το αρνητικό control ($p < 0.05$)

Βότανο	Συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Ενδοκυττάρια επίπεδα ROS (μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση) (RFU)
Φλισκούνη	1.0	13778 $\pm$ 827
	0.6	9485 $\pm$ 732
	0.2	7546 $\pm$ 205

Στον Πίνακα 3.24 παρουσιάζεται η επίδραση του αφεψήματος από Φλισκούνη στα PC3. Η παρουσία του αφεψήματος επηρεάζει τα επίπεδα οξειδωτικού στρες επίσης με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Στη συγκέντρωση 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ φαίνεται να αυξάνει τα ενδοκυττάρια επίπεδα των ROS περίπου στα ίδια επίπεδα με το θετικό control. Επιπρόσθετα, φαίνεται να υπάρχει και πάλι ένα κατώτερο όριο συγκέντρωσης πάνω από το οποίο το αφέψημα από Φλισκούνη μπορεί να μεταβάλει την οξειδωτική κατάσταση των καρκινικών κυττάρων του προστάτη. Το συμπέρασμα αυτό πηγάζει από την παρατήρηση ότι στη συγκέντρωση 0.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ δεν παρουσιάζονται μεταβολές τα ενδοκυττάρια επίπεδα των δραστικών ενώσεων οξυγόνου ενώ αντίθετα παρουσιάστηκε μείωση των επιπέδων επωάζοντας με 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ αφεψήματος από Φλισκούνη.

Μελετώντας συνολικά τα αποτελέσματα (Εικόνα 3.7), τα ροφήματα των βοτάνων κατατάσσονται κατά σειρά αυξανόμενης δραστηριότητας ως προς την δυνατότητα να επάγουν οξειδωτικό στρες στα PC3 ως εξής: Φασκόμηλο < Τσάι βουνού < Δίκταμο < Φλισκούνη < Αντωνιάδα.



Εικόνα 3.7: Ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη μετά από επίδραση με αφεψήματα από Αντωνναΐδα, Δίκταμο, Τσαΐ βουνού, Φασκόμηλο και Φλισκούνη σε συγκεντρώσεις 0.2, 0.6 και 1.0 µg/mL. Ο (*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων που δεν έγινε επίδραση με το αφέψημα και εκείνων που επώαστηκαν με το αφέψημα

Συγκρίνοντας τα ενδοκυτταρικά επίπεδα των ROS στις δυο κυτταρικές καρκινικές σειρές, φάνηκε ότι τα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου απαιτούν υψηλότερα επίπεδα δραστικών ενώσεων οξυγόνου για να επιτελούν τη μεταβολική τους δραστηριότητα σε σχέση με τα καρκινικά κύτταρα του προστάτη. Επιπρόσθετα, η παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου στις καλλιέργειες προκάλεσε περαιτέρω αύξηση των επιπέδων των ROS στις δύο καρκινικές σειρές, με τη σημαντικότερη μεταβολή να παρατηρείται στα HT29. Αναφορικά με τη δράση των αφεψημάτων, η επώαση των κυττάρων με ορισμένα από αυτά προκάλεσε αύξηση των επιπέδων των ROS ξεπερνώντας ακόμα και τα ενδοκυτταρικά επίπεδα που καταγράφηκαν για το θετικό control (παρουσία H_2O_2). Συγκεκριμένα, παρουσία του αφεψήματος από Φασκόμηλο τα ενδοκυτταρικά επίπεδα των ROS ξεπέρασαν αυτά του θετικού control και στις δυο κυτταρικές καρκινικές σειρές. Αξίζει να σημειωθεί ότι η κατάταξη των αφεψημάτων με σειρά αυξανόμενης δραστηριότητας είναι περίπου ίδια και για τους δύο τύπους καρκίνου που μελετήθηκαν. Η παρουσία του αφεψήματος από Φασκόμηλο παρουσίασε την υψηλότερη αύξηση των ενδοκυτταρίων επιπέδων των ROS και στις δυο κυτταρικές σειρές, ενώ το αφέψημα από Φλισκούνη είχε την μικρότερη δραστηριότητα στα HT29, και το αφέψημα από Αντωνναΐδα στα PC3.

Δεν υπάρχουν μελέτες που να εξετάζουν την επίδραση αφεψημάτων από βότανα στα ενδοκυττάρια επίπεδα των ROS σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου και του προστάτη. Ωστόσο, υπάρχουν λίγες μελέτες, οι οποίες εξετάζουν πώς τα φυτοχημικά συστατικά επηρεάζουν τα ενδοκυττάρια επίπεδα των ROS σε διάφορες καρκινικές σειρές.

Στη μελέτη του Jaganathan βρέθηκε ότι καφεϊκό οξύ προκαλεί σημαντική αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων ROS σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου μετά από 24 και 48 ώρες επώασης (**Jaganathan, 2012**). Παρόμοια αποτελέσματα στην επαγωγή των ROS παρατηρήθηκαν μετά από 48 ώρες επώασης των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (HCT15) με ένα άλλο φαινολικό συστατικό, το π-κουμαρικό οξύ (συγκέντρωση 1400 $\mu\text{mol/L}$). Αξίζει να αναφερθεί, ότι η παραγωγή των ROS στα HCT15 μετά από επώαση με π-κουμαρικό οξύ παρουσιάζει θετική συσχέτιση με το χρόνο επώασης. Ο πιθανός μηχανισμός για την αυξημένη παραγωγή των ROS μπορεί να είναι η ενεργοποίηση της p53 που οδηγεί σε αυξημένη και μειωμένη ενεργοποίηση της Bax και του Bcl₂, αντίστοιχα με αποτέλεσμα την απόπτωση (**Jaganathan et al., 2013**).

Σημειώνεται ότι, η παραγωγή των ROS στα καρκινικά κύτταρα είναι αποτέλεσμα στρεσογόνων ή κυτταροτοξικών επιδράσεων. Η υπερβολική παραγωγή των ROS από φαινολικά συστατικά οδηγεί στην επαγωγή της απόπτωσης μέσω της ενεργοποίησης της MAPK. Επιπρόσθετα, η επιγαλλοκατεχίνη και η ρεσβερατρόλη αυξάνουν την p53 η οποία σχετίζεται με το μονοπάτι των Ras/ κινάση MAPK/MAPK οδηγώντας σε απόπτωση (**Chen et al., 2000**) (**Shih et al., 2002**).

Βιβλιογραφικά έχει αναφερθεί η ικανότητα των εκχυλισμάτων των βοτάνων αλλά και μεμονωμένων πολυφαινολικών συστατικών να επάγουν την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων και ο προτεινόμενος μηχανισμός στην πλειοψηφία των αναφορών ήταν η αύξηση των επιπέδων του οξειδωτικού στρες. Η συσχέτιση των αποτελεσμάτων των δοκιμών που έγιναν στα πλαίσια της παρούσας μελέτης ωστόσο δεν κατέδειξε την αύξηση των ROS ως τον προτεινόμενο μηχανισμό για την απόπτωση και την αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση S. Η απουσία συσχέτισης γίνεται εύκολα αντιληπτή παρατηρώντας τα αποτελέσματα που προέκυψαν ύστερα από επίδραση με το αφέψημα

από Φλισκούνη. Συγκεκριμένα, το αφέψημα από Φλισκούνη προκάλεσε απόπτωση της τάξης του 43.94 και 66.62% στα HT29 και στα PC3 αντίστοιχα, ωστόσο δεν παρατηρήθηκαν εμφανείς μεταβολές στα ενδοκυτταρικά επίπεδα των δραστικών ενώσεων σε σχέση με το αρνητικό control. Συνεπώς, η υπόθεση που προκύπτει από τα παραπάνω είναι ότι για την επαγωγή της απόπτωσης, που καταγράφηκε για τα αφεψήματα των βοτάνων, εμπλέκονται περισσότεροι του ενός μηχανισμοί πέρα από την αύξηση των επιπέδων του οξειδωτικού στρες γεγονός που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

3.3. Επίλογος – Συμπέρασμα

Η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου σημειώνει αύξηση τα τελευταία χρόνια ενώ αποτελεί την δεύτερη αιτία θανάτου παγκοσμίως. Έτσι, τις τελευταίες δεκαετίες το επιστημονικό ενδιαφέρον εστιάστηκε στην αναζήτηση φυσικών προϊόντων ως μια άμεσα εφαρμόσιμη, αποδεκτή και προσιτή προσέγγιση για την πρόληψη και για την διαχείριση του καρκίνου. Σε αυτά συγκαταλέγονται τα φρούτα, τα λαχανικά, τα δημητριακά ολικής άλεσης, τα αφεψήματα βοτάνων αλλά και μικροσυστατικά όπως βιταμίνες, μέταλλα, ιχνοστοιχεία και ενώσεις που δεν έχουν θρεπτική αξία. Σε ανασκόπηση της βιβλιογραφίας παρατηρούμε πολλές μελέτες που υποστηρίζουν ότι η υιοθέτηση μιας υγιεινής διατροφής μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στην μείωση της εμφάνισης χρόνιων νοσημάτων συμπεριλαμβανομένων των διαφόρων τύπων καρκίνου που σχετίζονται με τη διατροφή όπως ο καρκίνος του προστάτη, του παχέος εντέρου και του μαστού.

Τα πλεονεκτήματα των διατροφικά προσλαμβανόμενων βιοδραστικών συστατικών σε σχέση με τα φάρμακα είναι ότι: α) πρόκειται για ευρέως διαδεδομένα συστατικά, που χαρακτηρίζονται από ελάχιστη ή μικρότερη τοξικότητα σε σύγκριση με τα φάρμακα. Επιπρόσθετα, πρόκειται για παράγοντες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πολλά στάδια παρέμβασης επιδρώντας ταυτόχρονα σε περισσότερους από ένα μηχανισμούς και παρέχοντας τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν ακόμα και όταν οι προνεοπλασματικές αλλοιώσεις είναι μη ανιχνεύσιμες.

Τα ροφήματα βοτάνων είναι γνωστά και ευρέως χρησιμοποιούμενα από την αρχαιότητα για τις ωφέλιμες επιδράσεις τους στην υγεία.. Σήμερα γνωρίζουμε ότι οι ωφέλιμες επιδράσεις των αφεψημάτων οφείλονται στην παρουσία των φυτοχημικών.

Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι τα αφεψήματα από Αντωναΐδα, Δίκταμο, Τσαί του βουνού, Φασκόμηλο και Φλισκούνη αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επάγουν την απόπτωση. Συγκεκριμένα, στα HT29, το αφέψημα με τη μεγαλύτερη επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ήταν το Φλισκούνη ενώ ακολουθούν το Δίκταμο, το Φασκόμηλο, το Τσαί του βουνού και η Αντωναΐδα. Το αφέψημα με την

μεγαλύτερη επίδραση στην επαγωγή της απόπτωσης στα HT29 ήταν το Φλισκούνι, ακολουθούν το Δίκταμο, το Φασκόμηλο, το Τσάι του βουνού, ενώ το αφέψημα από Αντωναΐδα δεν φαίνεται να προκαλεί απόπτωση. Συγκρίνοντας την επίδραση των αφεψημάτων στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην απόπτωση στα PC3 παρατηρήθηκε ότι το Φλισκούνι έχει την μεγαλύτερη επίδραση ενώ ακολουθούν το Δίκταμο, το Φασκόμηλο, το Τσάι του βουνού και η Αντωναΐδα

Η παρουσία των αφεψημάτων στα HT29 αύξησε τα ενδοκυττάρια επίπεδα των ROS. Συγκεκριμένα, τα αφεψήματα από Αντωναΐδα και Δίκταμο αύξησαν τα ενδοκυττάρια επίπεδα των ROS και στις τρεις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν ενώ τα αφεψήματα από Τσάι του βουνού και Φασκόμηλο μόνο στις συγκεντρώσεις 0.6 και 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Το αφέψημα από Φλισκούνι δεν επηρεάζει τα ενδοκυττάρια επίπεδα ROS. Στα PC3, τα αφεψήματα από Δίκταμο, Τσάι του βουνού, Φασκόμηλο και Φλισκούνι στη συγκέντρωση 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με το αρνητικό control. Το αφέψημα από Αντωναΐδα δεν φάνηκε να επηρεάζει τα ενδοκυττάρια επίπεδα οξειδωτικού στρες.

Βρέθηκε ότι ο μηχανισμός, μέσω του οποίου τα αφεψήματα των βοτάνων προκαλούν την απόπτωση και την αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση S σχετίζεται ελάχιστα ή είναι ανεξάρτητος με την επαγωγή του οξειδωτικού στρες. Η απουσία συσχέτισης γίνεται εύκολα αντιληπτή παρατηρώντας τα αποτελέσματα που προέκυψαν ύστερα από επίδραση με το αφέψημα από Φλισκούνι. Συγκεκριμένα, το αφέψημα από Φλισκούνι προκάλεσε απόπτωση της τάξης του 43.94 και 66.62% στα HT29 και στα PC3 αντίστοιχα, ωστόσο δεν παρατηρήθηκαν εμφανείς μεταβολές στα ενδοκυτταρικά επίπεδα των δραστικών ενώσεων σε σχέση με το αρνητικό control.

Συμπερασματικά, πρέπει να γίνουν επιπλέον μελέτες για τη διαλεύκανση των μηχανισμών μέσω των οποίων τα αφεψήματα που μελετήθηκαν επιδεικνύουν τη δράση τους. Η επιβεβαίωση των ευρημάτων αυτών, με *in vitro* μελέτες αλλά και με *in vivo* κλινικές δοκιμές, θα μπορούσε να αναδείξει τα αφεψήματα από Αντωναΐδα, Δίκταμο, Τσάι του βουνού, Φασκόμηλο και Φλισκούνι ως λειτουργικά τρόφιμα στη Μεσογειακή διατροφή που συμβάλλουν στην πρόληψη χρόνιων νοσημάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Agarwal, M., Parameswari, R. P., Vasanthi, H. R. & Das, D. K., 2012. Dynamic action of carotenoids in cardioprotection and maintenance of cardiac health. *Molecules*, Volume 17, p. 4755–4769.
2. Agnihotri, V. K. et al., 2005. Essential oil composition of *Mentha pulegium* L. growing wild in the north-western Himalayas India. *Flavour Fragrance J.*, Volume 20, p. 607–610.
3. Ait-Ouazzou, A. et al., 2012. Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*, and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. *Food Research International*, 45(1), pp. 313-319.
4. Alexopoulos, A. et al., 2011. Antibacterial activities of essential oils from eight greek aromatic plants against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Anaerobe*, Volume 17, p. 399–402.
5. Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S. & Chinou, I., 2001. Composition and Antimicrobial Activity of The essential Oils of Two *Origanum* species. *J. Agr. Food Chem.*, Volume 49, pp. 4168-4170.
6. Alvesalo, J. et al., 2006. Inhibitory effect of dietary phenolic compounds on *Chlamydia pneumoniae* in cell cultures. *Biochem Pharmacol*, Volume 71, p. 735–741.
7. Armata, M. et al., 2008. Constituents of *Sideritis syriaca* spp. *Syriaca* (Lamiaceae) and their antioxidant activity. *Food Chemistry*, Volume 111, p. 179–186.
8. Babio, B., 1999. NADPH oxidase: an update. *Blood*, 93(5), p. 1464–1476.
9. Bach-Faiga, A. et al., 2011. Mediterranean diet pyramid today. Science and cultural updates. *Public Health Nutrition*, December, 14(12A), pp. 2274-2284.
10. Bae, Y. S. et al., 2000. Platelet-derived Growth Factor-induced H₂O₂ Production Requires the Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase. *J Biol Chem.*, 275(14), p. 10527–10531.

11. Bagchi, D., Sen, C. K., Bagchi, M. & Atalay, M., 2004. Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula. *Biochem. Moscow*, Volume 69, p. 75–80.
12. Balkwill, F., 2009. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer*, 9(5), p. 361–371.
13. Baumann, H., 1996. *Greek Wild Flowers and Plant Lore in Ancient Greece*. London, U.K: The Herbert Press Ltd.
14. Baydar, N. G., Sagdic, O., Ozkan, G. & Cetin, S., 2006. Determination of antibacterial effects and total phenolic contents of grape (*Vitis vinifera* L.) seed extracts. *Int. J. Food Sci. Technol.*, Volume 41, p. 799–804.
15. Beattie, J., Crozier, A. & Duthie, G., 2005. Potential health benefits of berries. *Curr Nutr Food Sci*, Volume 1, pp. 71-86.
16. Beckman, C., 2000. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants?. *Physiol Mol Plant Pathol*, Volume 57, p. 101 – 110.
17. Bedard, K. & Krause, K. H., 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.*, Volume 87, p. 245–313.
18. Benetou, V. et al., 2008. Conformity to traditional Mediterranean diet and cancer incidence: the Greek EPIC cohort. *British Journal of Cancer*, Volume 99, p. 191–195.
19. Berasain, C. et al., 2009. Inflammation and liver cancer: new molecular links. *Ann N Y Acad Sci.*, Volume 1155, p. 206–221.
20. Bertelli, A. A. & Das, D. K., 2009. Grapes, wines, resveratrol, and heart health. *J. Cardiovasc. Pharmacol*, Volume 54, p. 468–476.
21. Bestwick, C. S., Milne, L. & Duthie, S. L., 2007. Kaempferol induced inhibition of HL-60 cell growth results from a heterogeneous response, dominated by cell cycle alterations. *Chem. Biol. Interact*, Volume 170, p. 76–85.
22. Block, G., Patterson, B. & Subar, A., 1992. Fruit, vegetables, and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. *Nutr. Cancer*, Volume 18, pp. 1-29.

23. BM., B., 1995. The respiratory burst oxidase. *Curr Opin Hematol.*, 2(1), p. 55–60.
24. Borel, F., Lacroix, F. & Margolis, R., 2002. Prolonged arrest of mammalian cells at the G1/S boundary results in permanent S-phase stasis. *J Cell Sci* , Τόμος 115, pp. 2829-2838.
25. Borneo, R. και συν., 2009. Antioxidant capacity of medicinal plants from the Province of Córdoba (Argentina) and their *in vitro* testing in a model food system. *Food Chem.*, Τόμος 112, p. 664–670.
26. Bouaziz, M., Chamkha, M. & Sayadi, S., 2004. Comparative study on phenolic content and antioxidant activity during maturation of the olive cultivar Chemlali from Tunisia. *J. Agric. Food Chem.*, Volume 52, p. 5476–5481.
27. Boukhebti, H. et al., 2011. Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L and *Mentha spicata* L essential oils. *Der Pharmacia Lettre*, 3(4), pp. 267-275.
28. Bown D., 2001. *The Herb Society of America new encyclopedia of herbs & their uses*. New York: DK.: s.n.
29. Breecher, G. R. & Khachik, F., 1992. Qualitative relationship of dietary and plasma carotenoids in human beings. *Ann. N. Y. Acad. Sci. USA*, Τόμος 669, p. 320–321.
30. Britton, G., Liaaen-Jensen, S. & Pfander, H., 2004. *Carotenoids Handbook*. s.l.:Birkhäuser Publishing.
31. Brookes, P. S. και συν., 2004. Calcium, ATP, and ROS:A mitochondrial love-hate triangle. *Am. J. Physiol.*, Τόμος 287, p. C817–C833.
32. Burdon, R., 1995. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *FreeRadic Biol Med.*, 18(4), pp. 775-794.
33. Burk, R., 2002. Selenium, an antioxidant nutrient. *Nutr. Clin. Care*, Volume 5, p. 75–79.
34. Canene-Adams, K. et al., 2007. Combinations of tomato and broccoli enhance antitumor activity in dunning r3327-h prostate adenocarcinomas. *Cancer Res*, 67(2), pp. 836-843.

35. Carluccio, M. A. et al., 2003. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: Antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals.. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, Volume 23, p. 622–629.
36. Castellanos, G. J., Prieto, J. & Heinrich, M., 2009. Gomez Castellanos JRed lapacho (*Tabebuia impetiginosa*) - a global ethnopharmacological commodity?. *J Ethnopharmacol*, Volume 121, pp. 1-13.
37. Chalchat, J., 2000. Essential oil of wild growing *Mentha pulegium* L. from Yugoslavia. *J. Essent.Oil Res.*, Τόμος 12, p. 598–600.
38. Chavez, J. H. και συν., 2006. Evaluation of antiviral activity of phenolic compounds and derivatives against rabies virus. *Vet. Microbiol.*, Τόμος 116, p. 53–59.
39. Chen, C. και συν., 2003. Epigallocatechin-3-gallate-induced stress signals in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Carcinogenesis*, 24(8), p. 1369– 1378.
40. Chen, C., Yu, R., Owuor, E. & Kong, A., 2000. Activation of antioxidant-response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival and death. *Arch Pharm Res*, Τόμος 23, pp. 605-612.
41. Chen, Q., Olashaw, N. & Wu, J., 1995. Participation of reactive oxygen species in the lysophosphatidic acidstimulated mitogen-activated protein kinase kinase activation pathway. *J Biol Chem*, 270(48), p. 28499–28502.
42. Cherbonnel-Lasserre, C. & Dosanjh, M., 1997. Suppression of apoptosis by overexpression of Bcl-2 or Bcl-xL promotes survival and mutagenesis after oxidative damage. *Biochimie*, 79(9-10), pp. 613-617.
43. Chiarugi, P. & Fiaschi, T., 2007. Redox signalling in anchorage-dependent cell growth. *Cell Signal.*, 19(4), p. 672–682.
44. Chinou, I., Liolios, C., Moreau, D. & Roussakis, C., 2007. Cytotoxic activity of *Origanum dictamnus*. *Fitoterapia*, Τόμος 78, p. 342–344.
45. Christensen, K. και συν., 2010. Activation of the nuclear receptor PPAR_α by metabolites isolated from sage (*Salvia officinalis* L.). *Journal of Ethnopharmacology*, Τόμος 132, p. 127—133.

46. Corti, R., Flammer, A. J., Hollenberg, N. K. & Luscher, T. F., 2009. Cocoa and cardiovascular health. *Circulation*, Τόμος 119, p. 1433–1441.
47. Cos, P. και συν., 1998. Structure–activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xantine oxidase and superoxide scavengers. *J Nat Prod*, Τόμος 61, pp. 71-76.
48. Csokay, B., Prajda, N., Weber, G. & Olah, E., 1997. Molecular mechanisms in the antiproliferative action of quercetin. *Life Sci.*, Τόμος 60, p. 2157–2163.
49. Cuvelier, M.-E., Richard, H. & Berset, C., 1996. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *JAOCs*, Τόμος 73, pp. 645-652.
50. Daglia, M., 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotechnol.*, Τόμος 23, pp. 174-181.
51. Das, D., Arber, N. & Jankowski, J., 2007. Chemoprevention of colorectal cancer. *Digestion*, Τόμος 76, pp. 51-67.
52. Dasgupta, B. & Milbrandt, J., 2007. Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Τόμος 104, p. 7217–7222.
53. Davalli, P. και συν., 2012. Anticancer activity of green tea polyphenols in prostate gland. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Τόμος 2012, pp. 984219-984238.
54. Deng, G. F. και συν., 2013. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 vegetables. *J. Funct. Food.*, Τόμος 5, p. 260–266.
55. Deng, G. F. και συν., 2012. Potential of fruit wastes as natural resources of bioactive compounds.. *Int. J. Mol. Sci.*, Τόμος 13, p. 8308–8323..
56. Deng, G. F. και συν., 2013. Phenolic compounds and bioactivities of pigmented rice. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, Τόμος 53, p. 296–306.
57. Desch, S. και συν., 2010. Effect of cocoa products on blood pressure: systematic review and meta-analysis. *Am. J. Hypertens*, Τόμος 23, pp. 97-103.
58. Dicke, M., Agrawal, A. A. & Bruin, J., 2003. Plants talk, but are they deaf?. *Trends Plant Sci*, Τόμος 8, p. 403–405.

59. Dillard, C. J. & German, B. J., 2000. Phytochemicals: nutraceuticals and human health *J Sci Food Agric* 2000 80:1744±1756. *J Sci Food Agric*, Τόμος 80, pp. 1744-1756.
60. Dohadwala, M. M. & Vita, J. A., 2009. Grapes and cardiovascular disease. *J. Nutr.*, Τόμος 139, p. 1788S–1793S.
61. Donaldson, M., 2004. Nutrition and cancer: A review of the evidence for an anti-cancer diet. *Nutr. J.*, Τόμος 3, p. 19.
62. Duthie, G., Duthie, S. & Kyle, J., 2000. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutr Res Rev*, Τόμος 13, pp. 79-106.
63. Duthie, G. G., Gardner, P. T. & Kyle, J. A., 2003. Plant polyphenols: are they the new magic bullet?. *Proc. Nutr. Soc.*, Τόμος 62, p. 599–603.
64. Eroğlu, C., Seçme, M., Bağcı, G. & Dodurga, Y., 2015. Assessment of the anticancer mechanism of ferulic acid via cell cycle and apoptotic pathways in human prostate cancer cell lines. *Tumor Biology*, 36(12), pp. 9437-9446.
65. Felty, Q. και συν., 2005. Estrogen-induced mitochondrial reactive oxygen species as signal-transducing messengers. *Biochemistry*, 44(18), pp. 6900-6909.
66. Fernandes, R. και συν., 1972. *Europaea, Flora*. s.l.:Cambridge University Press.
67. Ferracane, R. και συν., 2008. Effects of different cooking methods on antioxidant profile, antioxidant capacity, and physical characteristics of artichoke. *J. Agric. Food Chem.*, Τόμος 56, p. 8601–8608.
68. Ferrali, M. και συν., 1997. Protection against oxidative damage of erythrocyte membranes by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Lett*, Τόμος 416, pp. 123-129.
69. Fiedor, J. & Burda, K., 2014. Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease. *Nutrients*, Τόμος 6, pp. 466-488.
70. Folmer, F. και συν., 2014. Anticancer effects of bioactive berry compounds. *Phytochem Rev*, Τόμος 13, p. 295–322.
71. Font Quer, P., 2000. *Plantas Medicinales*. Peninsula επιμ. Barcelona: El Dioscorides Renovado.

72. Forester, S. C., Choy, Y. Y., Waterhouse, A. L. & Oteiza, P. I., 2014 . The Anthocyanin Metabolites Gallic Acid, 3-O-Methylgallic Acid, and 2,4,6-Trihydroxybenzaldehyde Decrease Human Colon Cancer Cell Viability by Regulating Pro-Oncogenic Signals. *Mol Carcinog*, 53(6), pp. 432-439.
73. Formica, J. & Regelson, W., 1995. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol*, Τόμος 33, p. 1061–1080.
74. Fragaki, E., 1969. *Contribution to the Plant Local Names*. Athens (in Greek): s.n.
75. Fraser, P. D. & Bramley, P. M., 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*, Τόμος 43, p. 228–265.
76. Fu, L. και συν., 2011. Total phenolic contents and antioxidant capacities of herbal and tea infusions. *Int. J. Mol. Sci.*, Τόμος 12, p. 2112–2124.
77. Galleano, M., Oteiza, P. I. & Fraga, C. G., 2009. Cocoa, chocolate, and cardiovascular disease. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, Τόμος 54, p. 483–490.
78. Garcia-Alonso, J., Ros, G., Vidal- Guevara, M. & Periago, M. J., 2006. Acute intake of phenolic-rich juice improves antioxidant status in healthy subjects. *Nutr. Res.*, Τόμος 26, p. 330–339.
79. Garcia, C. S. και συν., 2016. Pharmacological perspectives from Brazilian *Salvia officinalis* (Lamiaceae): antioxidant, and antitumor in mammalian cells., *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* pp. 1678-2690 (<http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201520150344>)
80. Geou-Yarh, L. & Peter, S., 2010. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res.*, 44(5).
81. Giftson, J. S., Jayanthi, S. & Nalini, N., 2010. Chemopreventive efficacy of gallic acid, an antioxidant and anticarcinogenic polyphenol, against 1,2-dimethyl hydrazine induced rat colon carcinogenesis. *Invest. New Drugs*, Τόμος 28, p. 251–259.
82. Gliszczynska-Swiglo, A. και συν., 2006. Changes in the content of health-promoting compounds and antioxidant activity of broccoli after domestic processing. *Food Addit. Contam.*, Τόμος 23, pp. 1088-1098.

83. Gliszczynska-Swiglo, A. & Tyrakowska, B., 2003. Quality of commercial apple juices evaluated on the basis of the polyphenol content and the TEAC antioxidant activity. *J. Food Sci.*, Volume 68, p. 1844–1849.
84. Globocan, 2012. *Globocan: Estimated Cancer Incidence Mortality and Prevalence worldwide 2012.* [Ηλεκτρονικό]
Available at: <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/prostate-new.asp>
[Πρόσβαση 23 5 2015].
85. Globocan, W.-., 2012. *Globocan.* [Ηλεκτρονικό]
Available at: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheets.asp?>
[Πρόσβαση 22 4 2015].
86. Gomez-Rico, A., 2006. Phenolic and volatile compounds of extra virgin olive oil (*Olea europaea* L. Cv. Cornicabra) with regard to fruit ripening and irrigation management.. *J. Agric. Food Chem.*, Τόμος 54, p. 7130–7136.
87. Gonzalez-Burgos, E., Carretero, M. E. & Gomez-Serranillos, M. P., 2011. Sideritis spp.: Uses, chemical composition and pharmacological activities—A review. *Journal of Ethnopharmacology*, Τόμος 135, p. 209–225.
88. Gotsiou, P., Naxakis, G. & Skoula, M., 2002. Diversity in the composition of monoterpenoids of *Origanum microphyllum* (Labiatae). *Biochem.sytem. ecol.*, Τόμος 30, p. 865–879.
89. Goustin, A. S., Leof, E. B., Shipl, G. D. & Moses, H. L., 1986. Growth factors and cancer. *Cancer Res.*, 46(3), p. 1015–1029.
90. Griendling, K., Minieri, C., Ollerenshaw, J. & Alexander, R., 1994. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.*, 74(6).
91. Group, A. t., 1994. The effect of vitamin E and beta-carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N. Engl. J. Med.*, Τόμος 330, p. 1029–1035.
92. Group, C. S. T., 2015. *Cell Signal Technology.* [Ηλεκτρονικό]
Available at: <http://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=science-pathways>
[Πρόσβαση December 2015].

93. Gruenwald, J., Brendler, T. & Jaenicke, C., 2000. *PDR for Herbal Medicines*. Montvale, NJ.: Medical Economic Company Inc..
94. Grune, T., Schroeder, P. & Biesalski, H. K., 2005. *Low Molecular Weight Antioxidants*. In *The Handbook of Environmental Chemistry*; Springer. Berlin, Germany: s.n.
95. Guo, Y. J. και συν., 2012. Antioxidant capacities, phenolic compounds and polysaccharide contents of 49 edible macro-fungi.. *Food Funct*, Τόμος 3, p. 1195–1205.
96. Gurib-Fakim, A., 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, Τόμος 27, p. 1–93 .
97. Güvença, A., Houghtonb, P. J., Dumanc, H. & Coşkuna, M., 2005. Antioxidant activity studies on selected Sideritis species native to Turkey. *Pharmaceutical Biology*, Τόμος 43, p. 173–177.
98. Hajlaoui, H. και συν., 2009. Biological activities of the essential oils and methanol extract of tow cultivated mint species (*Mentha longifolia* and *Mentha pulegium*) used in the Tunisian folkloric medicine. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, Τόμος 25, p. 2227–2238.
99. Halliwell, B., 2006. Phagocyte-derived reactive species: Salvation or suicide?. *Trends Biochem. Sci.* , Τόμος 31, p. 509–515.
100. Halliwell, B. & Gutteridge, J., 1998. *Free radicals in biology and medicine*. third ed επιμ. Oxford: Oxford University Press.
101. Haslam, E., 1998. *Practical Polyphenolics: From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
102. Ietswaart, J., 1980. *A taxonomic vision of the Genus Origanum (Labiatae)* Ph.D. Thesis Leiden Botanical Series 4. s.l.:The Hague: Leiden University.
103. Ipek, E. και συν., 2005. Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrolevaluated by Ames Salmonella/microsomal test.. *Food Chemistry*, Τόμος 93, p. 551–556.

104. Issa, A. Y., Volate, S. R. & Wargovic, M. J., 2006. The role of phytochemicals in inhibition of cancer and inflammation: New directions and perspectives. *Journal of Food Composition and Analysis*, Τόμος 19, p. 405–419.
105. Jaganathan, S. K., 2012. Growth Inhibition by Caffeic Acid, One of the Phenolic Constituents of Honey, in HCT 15 Colon Cancer Cells. *The ScientificWorld Journal Volume*, Τόμος 2012, p. 372345.
106. Jaganathan, S. K., Supriyanto, E. & Mandal, M., 2013. Events associated with apoptotic effect of p -Coumaric acid in HCT-15 colon cancer cells. *World J Gastroenterol*, 19(43), pp. 7726-7734.
107. Jeong, W., Kim, I., Hu, R. & Kong, A., 2004. Modulatory properties of various natural chemopreventive agents on the activation of NF-kappaB signaling pathway. *Pharm Res*, 21(4), p. 661–670.
108. Jeremic, I. και συν., 2013. The Mechanisms of *in vitro* cytotoxicity of Mountain tea, *Sideritis scardica*, against the C6 glioma cell line. *Planta Med*, 79(16), pp. 1516-24.
109. Johnson, I. T., Williamson, G. & Musk, S. R., 1994. Anticarcinogenic factors in plant foods: A new class of nutrients. *Nutr. Res. Rev.*, Τόμος 7, pp. 175-204.
110. Jung, H. J. και συν., 2005. Fungicidal effect of resveratrol on human infectious fungi. *Arch. Pharm. Res.*, Τόμος 28, p. 557–560.
111. Kaliora, A. C. και συν., 2014. Phenolic profiles and antioxidant and anticarcinogenic activities of Greek herbal infusions; balancing delight and chemoprevention?. *Food Chemistry*, Τόμος 142, pp. 233-241.
112. Kaliora, A. & Kountouri, A., 2012. Chemopreventive activity of Mediterranean medicinal plants Cancer Prevention-From Mechanisms to Translational Benefits. *Tech Publishers*, pp. 261-283.
113. Kamkar, A., Javan, A. J., Asadi, F. & Kamalinelad, M., 2010. The antioxidative effect of Iranian *Mentha pulegium* extracts and essential oil in sunflower oil. *Food Chem. Toxicol.*, Τόμος 48, p. 1796–1800.
114. Kang, T. & Liang, N., 1997. Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 leukemia cells. *Biochem. Pharmacol*, Τόμος 54, p. 1013–1018.

115. Keys, A. et al., 1986. The diet and 15-year death rate in the Seven Countries Study. *Am J Epidemiol*, Volume 124, p. 903–915.
116. Kim, J. και συν., 2001. Protective effects of (–)-epigallocatechin-3-gallate on UVA- and UVB-induced skin damage.. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, Τόμος 14, p. 11–19.
117. Kim, J. και συν., 2006. Inhibition of EGFR signaling in human prostate cancer PC-3 cells by combination treatment with beta-phenylethyl isothiocyanate and curcumin. *Carcinogenesis*, 27(3), p. 475–482.
118. Koehn, F. & Carter, G., 2005. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, Τόμος 4, pp. 206-220.
119. Kogiannou, D. A. και συν., 2013. Herbal infusions; their phenolic profile, antioxidant and anti-inflammatory effects in HT29 and PC3 cells. *Food and Chemical Toxicology* , Τόμος 61, p. 152–159.
120. Koleva, I. I. και συν., 2003. Antioxidant activity screening of extracts from *Sideritis* species (Labiatae) grown in Bulgaria. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Τόμος 83, p. 809–819.
121. Kostyuk, V. A. και συν., 2011. Antioxidant and signal modulation properties of plant polyphenols in controlling vascular inflammation. *Eur. J. Pharmacol.*, Τόμος 658, p. 248–256.
122. Landis-Piwowar, K. R. και συν., 2007. A novel prodrug of the green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate as a potential anticancer agent. *Cancer Res.*, Τόμος 67, p. 4303–4310.
123. Lavelli, V., Fregapane, G. & Salvador, M. D., 2006. Effect of storage on secoiridoid and tocopherol contents and antioxidant activity of monovarietal extra virgin olive oils. *J. Agric. Food Chem*, Τόμος 54, p. 3002–3007.
124. Lee, T. J. και συν., 2006. Quercetin arrests G2/M phase and induces caspase-dependent cell death in U937 cells. *Cancer Lett*, Τόμος 240, p. 234–242.
125. Lemordant, D., Boukef, K. & Bensalem, M., 1977. Plantes utiles et toxiques de Tunisie. *Fitoterapia*, Τόμος 48, p. 191–214.
126. Lentini, F., 2000. The role of ethnobotics in scientific research. State of ethnobotanical knowledge in Sicily. *Fitoterapia*, Τόμος 71, p. S83–S88.

127. Leone, M. και συν., 2003. Cancer prevention by tea polyphenols is linked to their direct inhibition of antiapoptotic Bcl-2-family proteins. *Cancer Res*, 63(23), p. 8118–8121.
128. Levites, Y. και συν., 2001. Green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate prevents N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurodegeneration. *J. Neurochem.*, Τόμος 78, p. 1073–1082.
129. Lgcstandards, 2015. *Lgcstandards*. [Ηλεκτρονικό]
Available at: <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-38.aspx>
[Πρόσβαση 2015].
130. Li, F. και συν., 2013. Antiproliferative activities of tea and herbal infusions. *Food Funct.*, Τόμος 4, p. 530–538.
131. Li, H. B. & Chen, F., 2001. Preparative isolation and purification of astaxanthin from the microalga *Chlorococcum* sp. by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A*, Τόμος 925, p. 133–137.
132. Li, H. B. και συν., 2007. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae.. *Food Chem.*, Τόμος 102, p. 771–776.
133. Lima, C. και συν., 2006. Metformine-like effect of *Salvia officinalis* (common sage): is it useful in diabetes prevention?. *British Journal of Nutrition*, Τόμος 96, p. 326–333.
134. Li, S. και συν., 2012. Effect of ultrasound-assisted extraction on antioxidant activity of rose (*Rosa hybrida*) petals. *Int. J. Modern Biol. Med.*, Τόμος 2, p. 91–100.
135. Log̃og̃lu, E., Arslan, S., Oktemer, A. & Sakiyan, . I., 2006. Biological activities of some natural compounds from *Sideritis sipylea* Boiss. *Phytotherapy Research*, Τόμος 20, p. 294–297.
136. Lorenzo, D. και συν., 2002. Essential oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, Τόμος 45, p. 519–524.
137. Lotito, S. & Frei, B., 2006. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon?. *Free Radic Bio Med*, Τόμος 41, pp. 1727-1746.

138. Lo, Y. & Cruz, T., 1995. Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes. *J Biol Chem.*, 270(20), p. 11727–11730.
139. Luceri, C., Caderni, G., Sanna, A. & Dolara, P., 2002. Red wine and black tea polyphenols modulate the expression of cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase and glutathione-related enzymes in azoxymethane-induced f344 rat colon tumors.. *J. Nutr.*, Τόμος 132, pp. 1376-1379.
140. Luo, H. και συν., 2011. Kaempferol induces apoptosis in ovarian cancer cells through activating p53 in the intrinsic pathway. *Food Chem*, 128(2), p. 513–519.
141. Luther, M. και συν., 2007. Inhibitory effect of Chardonnay and black raspberry seed extracts on lipid oxidation in fish oil and their radical scavenging and antimicrobial properties. *Food Chem.*, Τόμος 104, p. 1065–1073.
142. Madsen, H. L., Bertelsen, G. & Skibsted, L. H., 1997. Antioxidative activity of spices and spice extracts. Στο: *Spices, Flavour Chemistry and Antioxidant Properties*. Washington, DC: American Chemical Society, pp. 176-187.
143. Mahboubi, M. & Haghi, G., 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *J. Ethnopharmacol.*, Τόμος 119, p. 325–327.
144. Marques-Vidal, P., Ravasco, P. & Camilo, E. M., 2006. Foodstuffs and colorectal cancer risk: a review. *Clin. Nutr.*, Τόμος 25, pp. 14-36.
145. Marrelli, M. και συν., 2015. *Composition, antibacterial, antioxidant and antiproliferative activities of essential oils from three Origanum species growing wild in Lebanon and Greece*. s.l.:Natural Product Research.
146. Marzouk, B. και συν., 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Tunisian *Mentha pulegium* L. *Journal: Food, Agriculture and Environment*, 6(1), pp. 78-82.
147. Meeran, S. M., Akhtar, S. & Katiyar, S. K., 2009. Inhibition of UVB-induced skin tumor development by drinking green tea polyphenols is mediated through DNA repair and subsequent inhibition of inflammation. *J. Investig. Dermatol.*, Τόμος 129, p. 1258–1270.

148. Mehta, R., Murillo, G., Naithani, R. & Peng, X., 2010. Cancer chemoprevention by natural products: How far have we come?. *Pharm Res*, Τόμος 27, pp. 950-961.
149. Meier, B. και συν., 1989. Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor-alpha. *Biochem J.*, 263(2), p. 539–545.
150. Meydani M, 2005. A Mediterranean-style diet and metabolic syndrome. *Nutr Rev.*, Volume 63, p. 312–314.
151. Miglio, C. και συν., 2008. Effects of different cooking methods on nutritional and physicochemical characteristics of selected vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, Τόμος 56, p. 139–147.
152. Mladěňka, P., Zatloukalová, L., Filipský, T. & Hrdina, R., 2010. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radic Biol Med*, Τόμος 15, p. 963–75.
153. Mullen, W. και συν., 2002. Effect of freezing and storage on the phenolics, ellagitannins, flavonoids, and antioxidant capacity of red raspberries. *J. Agric. Food Chem.*, Τόμος 50, p. 5197–5201.
154. Neto CC, 2007a. Cranberry and blueberry: evidence for protective effects against cancer and vascular diseases. *Mol Nutr Food Res* , Τόμος 51, p. 652–664.
155. Netter, F., 2009. Παθολογία 1 βασικές αρχές. Στο: Αθήνα: Πασχαλίδης, Π.Χ.
156. Newal, C., 1996. In *Herbal Medicines. A Guide for Health-Care Professionals* (L.A. Anderson and J.D. Philipson, eds.). London, U.K.: The Pharmaceutical Press.
157. Nijveldt, R. και συν., 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*, Τόμος 74, pp. 418-425.
158. Ninomiya, K. και συν., 2004. Carnosic acid, a new class of lipid absorption inhibitor from sage. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, Τόμος 14, p. 1943—1946.
159. Nomura, K. και συν., 2000. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by

- suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis. *Biochem. J.*, Τόμος 351, p. 183–193.
160. Oboh, G. & Henle, T., 2009. Antioxidant and inhibitory effects of aqueous extracts of *Salvia officinalis* leaves on pro-oxidant-induced lipid peroxidation in brain and liver *in vitro*. *Journal of Medicinal Food*, Τόμος 12, p. 77–84.
 161. Ohba, M., Shibamura, M., Kuroki, T. & Nose, K., 1994. Production of hydrogen peroxide by transforming growth factor-beta 1 and its involvement in induction of *egr-1* in mouse osteoblastic cells. *J Cell Biol.*, 126(4), p. 1079–1088.
 162. Okamura, N., Fujimoto, Y., Kuwabara, S. & Yagi, A., 1994. Highperformance liquid chromatographic determination of carnosic acid and carnosol in *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. *J. Chromatogr. A.*, Τόμος 679, pp. 81-386.
 163. O'Neill, M. E. και συν., 2001. A European carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use. *British Journal of Nutrition*, Τόμος 89, pp. 499-507.
 164. Oueslati, S. και συν., 2008. Physiological and antioxidant responses of *Mentha pulegium* (Pennyroyal) to salt stress. *Acta Physiol. Plant.*, Τόμος 32, p. 289–296.
 165. Pacher, P., Beckman, J. S. & Liaudet, L., 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev*, Τόμος 87, p. 315–424.
 166. Palmer, H. J. & Paulson, K. E., 1997. Reactive oxygen species and antioxidants in signal transduction and gene expression. *Nutr. Rev.*, Τόμος 55, p. 353–361.
 167. Pandey, K. B. & Rizvi, S. I., 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Med. Cell. Longev.*, Τόμος 2, p. 270–278.
 168. Pare, P. W. & Tumlinson, J. H., 1999. Plant volatiles as a defense against insect herbivores.. *Plant Physiol.*, Τόμος 121, pp. 325-331.
 169. Pecorari, M. και συν., 2010. Biomarkers of antioxidant status following ingestion of green teas at different polyphenol concentrations and antioxidant capacity in human volunteers. *Mol. Nutr. Food Res.*, Τόμος 54 (Suppl. 2), pp. S278-S283.
 170. Perez-Fons, L., Garzon, M. T. & Micol, V., 2010. Relationship between the antioxidant capacity and effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.)

- polyphenols on membrane phospholipid order. *J. Agric. Food Chem.*, Τόμος 58, p. 161–171.
171. Perron, N. R. και συν., 2011. Antioxidant and prooxidant effects of polyphenol compounds on copper-mediated DNA damage. *J. Inorg. Biochem.*, Τόμος 105, p. 745–753.
 172. Plioukas, M. και συν., 2010. Novel acylflavones from *Sideritis syriaca* spp. *Syriaca. Food Chemistry*, Τόμος 123, p. 116–141.
 173. Plumed-Ferrer, C. και συν., 2013. The antimicrobial effects of wood-associated polyphenols on food pathogens and spoilage organisms. *Int. J. Food Microbiol.*, Τόμος 164, p. 99–107.
 174. Procházková, D., Boušová, I. & Wilhelmová, N., 2011. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, Τόμος 82, pp. 513-523.
 175. Proestos, C. και συν., 2013. Antioxidant capacity of selected plant extracts and their essential oils. *Antioxidants*, Τόμος 2, pp. 11-22.
 176. Radi, R. και συν., 1991. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.*, Τόμος 266, p. 22028–22034.
 177. Ramos, S., 2007. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J Nutr Biochem*, Τόμος 18, pp. 427-442.
 178. Rao, Y., Geethangili, M., Fang, S. & Tzeng, Y., 2007. Antioxidant and cytotoxic activities of naturally occurring phenolic and related compounds: a comparative study. *Food Chem Toxicol*, Τόμος 45, p. 1770–1776.
 179. Rau, O. και συν., 2006. Carnosic acid and carnosol, phenolic diterpene compounds of the labiate herbs rosemary and sage, are activators of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Planta Medica*, Τόμος 72, pp. 881-887.
 180. Ravindran, J., Prasad, S. & Aggarwal, B., 2009. Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively?. *Aaps J*, 11(3), p. 495–510.
 181. Rhee, S., Bae, Y., Lee, S. & Kwon, J., 2000. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci STKE*, 2000(53), p. pe1.

182. Rice-Evans, C. A., Nicholas, M. J. & Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med*, Τόμος 20, pp. 933-956.
183. Richter, C., Park, J. W. & Ames, B. N., 1988. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Τόμος 85, p. 6465–6467.
184. Robards, K. και συν., 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem*, 66(4), pp. 401-436.
185. Robinson, M. & Zhang, X., 2011. *The World Medicines Situation*, s.l.: WHO.
186. Rodrigo, R. & Bosco, C., 2006. Oxidative stress and protective effects of polyphenols: Comparative studies in human and rodent kidney. A review. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, Τόμος 142, p. 317–327.
187. Rodrigo, R., Miranda, A. & Vergara, L., 2011. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clin. Chim. Acta*, Τόμος 412, p. 410–424.
188. Rossi, L. και συν., 2008. Benefits from dietary polyphenols for brain ageing and Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.*, Τόμος 33, p. 2390–2400.
189. Roy, D., Sarkar, S. & Felty, Q., 2006. Levels of IL-1 beta control stimulatory/inhibitory growth of cancer cells. *Front Biosci.*, Τόμος 11, p. 889–898.
190. Rump, A. και συν., 1995. Effects of different inotropes with antioxidant properties on acute regional myocardial ischemia in isolated rabbit hearts. *Gen Pharmacol*, Τόμος 26, pp. 603-611.
191. Sakanaka, S., Juneja, L. R. & Taniguchi, M., 2000. Antimicrobial effects of green tea polyphenols on thermophilic spore-forming bacteria. *J. Biosci. Bioeng.*, Τόμος 90, p. 81–85.
192. Samuel, S. M., Thirunavukkarasu, M. & Penumathsa, S., 2008. Akt/FOXO3a/SIRT1-mediated cardioprotection by n-tyrosol against ischemic stress in rat *in vivo* model of myocardial infarction: Switching gears toward survival and longevity. *Food Chem*, Τόμος 56, pp. 9692-9698.

193. Sanchez-Fidalgo, s. και συν., 2010. Dietary supplementation of resveratrol attenuates chronic colonic inflammation in mice. *Eur J Pharmacol*, 633(1-3), p. 78–84.
194. Sano, A. και συν., 2007. Beneficial effects of grape seed extract on malondialdehyde-modified LDL. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, Τόμος 53, p. 174–182.
195. Santangelo, C. και συν., 2007. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann. Ist. Super. Sanita*, Τόμος 43, p. 394–405.
196. Santhakumar, A. B., Bulmer, A. C. & Singh, I., 2013. A review of the mechanisms and effectiveness of dietary polyphenols in reducing oxidative stress and thrombotic risk. *J. Hum. Nutr. Diet.*, Τόμος 27, p. 1–21.
197. Santhakumar, A. B. και συν., 2015. Consumption of anthocyanin-rich queen garnet plum juice reduces platelet activation related thrombogenesis in healthy volunteers. *J. Funct. Food.*, Τόμος 12, p. 11–22.
198. Sardesai VM, 2002. Herbal medicines: poisons or potions?. *J Lab Clin Med* , Τόμος 139, pp. 343-348 .
199. Sautin, Y. Y. & Johnson, R. J., 2008. Uric acid: The oxidant-antioxidant paradox. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, Τόμος 27, p. 608–619.
200. Schmidt, B. και συν., 2008. A natural history of botanical therapeutics. *Metabolism*, Τόμος 57, pp. S3 - S9.
201. Segal, A. & Shatwell, K., 1997. The NADPH oxidase of phagocytic leukocytes. *Ann N Y Acad Sci.*, Τόμος 832, p. 215–222.
202. Serra-Majem, L., Roman, B. & Estruch, R., 2006. Scientific evidence of interventions using the Mediterranean diet: a systematic review. *Nutrition Reviews*, 64 (Suppl. 1), p. S27–S47.
203. Sheu, S. S., Nauduri, D. & Anders, M. W., 2006. Targeting antioxidants to mitochondria: A new therapeutic direction. *Biochim. Biophys. Acta*, Τόμος 1762, p. 256–265.
204. Shih, A., Davis, F., Lin, H. & Davis, P., 2002. Resveratrol induces apoptosis in thyroid cancer cell lines via a MAPK- and p53- dependent mechanism. *J Clin Endocrinol Metab*, Τόμος 87, pp. 1223-1232.

205. Simon, H., Haj-Yehia, A. & Levi-Schaffer, F., 2000. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*, 5(5), p. 415–418.
206. Simon, J., Alena, F. & Lyle, E., 1984. *Herbs: an indexed bibliography 1971-1980 - the scientific literature on selected herbs, and aromatic and medicinal plants of the temperate zone*. s.l.:Archon Books. (HSA Library)..
207. Singh, I. και συν., 2008. The effects of polyphenols in olive leaves on platelet function. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, Τόμος 18, pp. 127-132.
208. Skoula, M. & Sotiris K, K., 1997. *Origanum dictamnus L. and Origanum vulgare L.subsp. hirtum (Link) Letswaart: traditional uses and production in Greece*. In *Oregano:proceedings of the IPGRI international workshop on oregano 8-12May1996*. Edited by S. Padulosi επιμ. CIHEAM, Valenzano(Bari), Italy: Rome: Int. Plant Genetic Resources Institute.
209. Skrubis, B., 1979. *Origanum dictamnus L.*, a Greek native plant. *Journal of Ethnopharmacology*, 1(3), p. 411–415..
210. Sofi, F. et al., 2008. Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis. *BMJ*, September, Volume 337, p. a1344.
211. Song, F. L. και συν., 2010. Total phenolic contents and antioxidant capacities of selected Chinese medicinal plants. *Int. J. Mol. Sci.*, Τόμος 11, p. 2362–2372.
212. Srivastava, J., Lambert, J. & Vietmeyer, N., 1996. Medicinal Plants: An Expanding Role in Development. *World Bank Technical Paper*.
213. Stadtman, E. R. & Levine, R. L., 2000. Protein oxidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci. USA*, Τόμος 90, p. 191–208.
214. Stewart, J. R., Arttime, M. C. & O'Brian, C. A., 2003. Resveratrol: A candidate nutritional substance for prostate cancer prevention. *J. Nutr.*, Τόμος 133, p. 2440S–2443S.
215. Stoner, G., Wang, L. & Casto, B., 2008. Laboratory and clinical studies of cancer chemoprevention by antioxidants in berries. *Carcinogenesis*, Τόμος 29, p. 1665–1674.
216. Storz, P., 2005. Reactive oxygen species in tumor progression. *Front. Biosci.*, Τόμος 10, p. 1881–1896.

217. Stoyanova, A., Kula, G. V. & Majda, T., 2005. Chemical composition of the essential oil of *Mentha pulegium* from Bulgaria. *J. Essent. Oil Res.*, Τόμος 17, p. 475–477.
218. Subarnas, A. & Wagner, H., 2000. Analgesic and anti-inflammatory activity of the proanthocyanidins shellegueain A from *Polypodium feei*. *Phytomedicine*, Τόμος 7, pp. 401-405.
219. Sundaresan, M. και συν., 1995. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science*, 270(5234), p. 296–299.
220. Sun, J. και συν., 2010. Antioxidant activities and contents of polyphenol oxidase substrates from pericarp tissues of litchi fruit.. *Food Chem.*, Τόμος 119, p. 753–757.
221. Surh, Y., 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer*, Τόμος 3, pp. 768-780.
222. Surh, Y., 2008. NF-κB and Nrf2 as potential chemopreventive targets of some anti-inflammatory and antioxidative phytonutrients with anti-inflammatory and antioxidative activities. *Asia Pac J Clin Nutr*, 17(1), pp. 269-272.
223. Szatrowski, T. & Nathan, C., 1991. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.*, 51(3), p. 794–798.
224. Tair, A. και συν., 2014. *Origanum* species native to the island of Crete: *in vitro* antioxidant characteristics and liquid chromatography–mass spectrometry identification of major polyphenolic components. *Natural Product Research*, 28(16), p. 1284–1287.
225. Taiz, L. & Zeiger, E., 2006. *Secondary metabolites and plant defense*. Hardback επιμ. s.l.:Plant physiology.
226. Teixeira, B. και συν., 2012. European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. *Industrial Crops and Products*, 36(1), pp. 81-87.
227. Ternes, W. & Schwarz, K., 1995. Antioxidat constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* IV. Determination of carnosic acid in different foodstuffs. *Z. Lebensm.Unters. Forsch.*, Τόμος 201, pp. 548-550.

228. Thanos, C., 1994. *Aristotle and Theophrastus on plant-animal interactions*. In: Arianoutsou, M., Groves, R.H. (Eds.), *Plant–Animal Interactions in Mediterranean-Type Ecosystems*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
229. Thomas E. Andreoli, M., 2003. Καρκίνος. Στο: *Cecil παθολογία*. Πέμπτη έκδοση επιμ. s.l.:Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας Α΄ τόμος, pp. 597-599.
230. Tiku, M., Liesch, J. & Robertson, F., 1990. Production of hydrogen peroxide by rabbit articular chondrocytes. Enhancement by cytokines. *J Immunol.*, 145(2), pp. 690-696.
231. Tinggi, U., 2008. Selenium: Its role as antioxidant in human health. *Environ. Health Prev. Med.*, Τόμος 13, p. 102–108.
232. Tirrillini, B. και συν., 2001. Composition of the oil of *Sideritis syriaca* L. from Italy. *Journal of the Essential Oil Research*, Τόμος 13, p. 444–445.
233. Torabian, S. και συν., 2009. Acute effect of nut consumption on plasma total polyphenols, antioxidant capacity and lipid peroxidation. *J. Hum. Nutr. Diet.*, Τόμος 22, p. 64–71.
234. Trichopoulou A, 2004. Traditional Mediterranean diet and longevity in the elderly: a review.. *Public Health Nutr*, Τόμος 7, pp. 943-947.
235. Vaher, M., Ehala, S. & Kaljurand, M., 2005. On-column capillary electrophoretic monitoring of rapid reaction kinetics for determination of the antioxidative potential of various bioactive phenols. *Electrophoresis*, Volume 26, p. 990–1000.
236. Vainio, H., 2006. Weiderpass, E. Fruit and vegetables in cancer prevention. *Nutr. Cancer*, Τόμος 54, pp. 111-142.
237. van Acker, S. και συν., 1995. Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochem Biophys Res Commun*, Τόμος 214, pp. 755-759.
238. van Acker, S., Tromp, M., Haenen, G. & van der Vijgh, W., 1995. Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochem Biophys Res Commun*, Τόμος 214, pp. 755-759.
239. Vauzour, D. και συν., 2010. Polyphenols and human health: Prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients*, Τόμος 2, p. 1106–1131.

240. Vita, J., 2005. Polyphenols and cardiovascular disease: Effects on endothelial and platelet function. *Am. J. Clin. Nutr.*, Τόμος 81, p. 292S–297S.
241. von Lintig, J., 2010. Colors with functions: Elucidating the biochemical and molecular basis of carotenoid metabolism. *Annual Review of Nutrition*, Τόμος 30, p. 35–56.
242. Voorrips, L. E. και συν., 2000. A prospective cohort study on antioxidant and folate intake and male lung cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, Τόμος 9, p. 357–365.
243. Weber, J., Ruzindana-Umunyana, A., Imbeault, L. & Sircar, S., 2003. Inhibition of adenovirus infection and adenain by green tea catechins. *Antivir Res*, Τόμος 58, p. 167–173.
244. Wen, X. και συν., 2013. Deconvoluting the role of reactive oxygen species and autophagy in human diseases. *Free Radic. Biol. Med.*, Τόμος 65, p. 402–410.
245. Wenzel, U., Kuntz, S., Brendel, M. D. & Daniel, H., 2000. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res.*, Τόμος 60, p. 3823–3831.
246. WHO, 2015. <http://www.who.int/topics/nutrition/en/>. [Online] Available at: <http://www.who.int/topics/nutrition/en/>
247. Widlansky, M. και συν., 2005. Effects of black tea consumption on plasma catechins and markers of oxidative stress and inflammation in patients with coronary artery disease. *Free Radic Biol Med*, Τόμος 38, p. 499–506.
248. Williamson EM, 2001. Synergy and other interactions in phytochemicals. *Phytochemistry*, Τόμος 8, pp. 401-409.
249. Wink, M., 1987. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theor. Appl. Genet.*, Τόμος 75, pp. 225-233.
250. Winterbourn, C. C., Vissers, M. C. & Kettle, A. J., 2000. Myeloperoxidase. *Curr. Opin. Hematol.*, Τόμος 7, p. 53–58.
251. Woods, R. K. και συν., 2003. Food and nutrient intakes and asthma risk in young adults. *Am. J. Clin. Nutr.*, Τόμος 78, p. 414–421.

252. Woo, K. J., Jeong, Y. J., Park, J. W. & Kwon, T. K., 2004. Chrysin-Induced apoptosis is mediated through caspase activation and Akt inactivation in U937 leukemia cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, Τόμος 325, p. 1215–1222.
253. World Cancer Research Fund, I., 2015. WHO. [Ηλεκτρονικό] Available at: <http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/data-specific-cancers/prostate-cancer-statistics> [Πρόσβαση 22 4 2015].
254. Xia, E. Q. και συν., 2011. Ultrasound-assisted extraction of phillyrin from *Forsythia suspensa*. *Ultrason. Sonochem.*, Τόμος 18, p. 549–552.
255. Xiao, H. & Yang, C., 2008. Combination regimen with statins and NSAIDs: a promising strategy for cancer chemoprevention.. *Int J Cancer*, 123(5), p. 983–990.
256. Xie J, I. S., 2008. Cancer in inflammatory bowel disease.. *World J Gastroenterol.*, 14(3), pp. 378-389.
257. Xu, Y., Jiang, Z., Ji, G. & Liu, J., 2010. Inhibition of bone metastasis from breast carcinoma by rosmarinic acid. *Planta Med*, 76(10), p. 956–962.
258. Xu, Y. και συν., 2010a. Anti-invasion effect of rosmarinic acid via the extracellular signal-regulated kinase and oxidation-reduction pathway in Ls174-T cells. *J Cell Biochem*, 111(2), pp. 370-379.
259. Yeh, S., Wang, W., Huang, C. & Hu, M., 2005. Pro-oxidative effect of β - carotene and the interaction with flavonoids on UVA-induced DNA stand breaks in mouse fibroblast C3H10T1/2 cells. *J. Nutr Biochem*, Τόμος 16, pp. 729-735.
260. Young, D., Hu, Y., Le Leu, R. & Nyskohus, L., 2005. Dietary fibre and colorectal cancer: a model for environment-gene interactions. *Mol Nutr Food Res*, Τόμος 49, pp. 571-84.
261. Young, I. & Woodside, J., 2001. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*, Τόμος 54, p. 176–86.
262. Zargari A., 1997. *Medicinal plants*. 6th ed. επιμ. Tehran: Tehran University Publications.
263. Κατσιλάμπρος, Ν. Λ., 2010. Λειτουργικά τρόφιμα και συγγενείς κατηγορίες. Στο: Β. έκδοση, επιμ. *Κλινική διατροφή*. Αθήνα: Ιατρικές εκδόσεις ΒΗΤΑ, pp. 264-265.

264. Κουνδουράκη Χαρίκλεια (2013). Συγκριτική μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης αφεψημάτων από Ελληνικά βότανα in vitro. Πτυχιακή Εργασία. Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο.
265. Μαργαρίτης, Λ. Χ. και συν., 2008. *Βιολογία του κυττάρου*. Τέταρτη έκδοση επιμ. Αθήνα: Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας.
266. Μαρμαράς, Β. & Λαμπροπούλου-Μαρμαρά, Μ., 2005. *Βιολογία κυττάρου - Μοριακή προσέγγιση*. Πέμπτη έκδοση επιμ. Πάτρα: Τυρογάμα.
267. Μελέκος, Μ. Δ. & Μητσογιάννης, Η. Χ., 2003. Οι επιπτώσεις της παχυσαρκίας και της δίαιτας στον καρκίνο του προστάτη. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής*, 20(6), pp. 594-608.